

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**PREVALENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD DEL VIRUS DE LA MANCHA
BLANCA (WSSV) EN EL ACOCIL EXÓTICO *Cherax quadricarinatus* Von
Martens, 1868 CULTIVADO EN GRANJAS DEL NORESTE DE MÉXICO**

POR

M.C. MARTHA SILVIA TIRADO VELARDE

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

OCTUBRE, 2016

APROBACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL POR EL COMITÉ DE TESIS

**PREVALENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD DEL VIRUS DE LA MANCHA
BLANCA (WSSV) EN ACOCIL EXÓTICO *Cherax quadricarinatus* Von Martens,
1868 CULTIVADO EN GRANJAS DEL NORESTE DE MÉXICO**

COMITÉ DE TESIS

Dr. Gabino A. Rodríguez Almaráz (Director de tesis)

Dr. Roberto Mercado Hernández (Secretario)

Dr. Feliciano Segovia Salinas (Vocal 1)

Dr. Francisco Iruegas Buentello (Vocal 2)

Dr. Jesús Montemayor Leal (Vocal 3)

Dr. Alberto Morales Loredó (Director externo)

Dra. Ma. Genoveva Álvarez Ojeda (Director externo)

DEDICATORIA

A Dios por permitirme realizar uno más de mis sueños.

A mis hijos Sonia, Martha Edith y Juan Alfredo por darme mi espacio y entender la importancia de mi desarrollo personal y profesional.

A mis padres y hermanos por apoyarme siempre en mi empeño hacia conseguir mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada.

A la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, al Dr. Ricardo Gómez y a la Dra. Diana Rezéndez Pérez.

Al Laboratorio Central Regional de Monterrey del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León, a su Director General Ing. José Guadalupe Muraira Gutiérrez por permitirme desarrollar el trabajo técnico experimental de la tesis.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, por el apoyo financiero para llevar a buen término este trabajo.

Al Dr. Gabino A. Rodríguez Almaraz director de tesis por todo el apoyo que me ofreció, por responsabilizarse de la realización del proyecto y por creer en mí.

Al Dr. Alberto Morales Loredo por su desempeño como Director de tesis, por las facilidades prestadas para la realización del trabajo técnico científico en el Laboratorio Central Regional de Monterrey, hoy Laboratorio Central Regional del Norte, S.A. de C.V., del cual es Director Técnico, así como por su asesoría en Biología Molecular y Biotecnología.

A la Dra. Genoveva Álvarez por su enorme dedicación y empeño hacia el cumplimiento de esta tesis, por los recursos económicos destinados y asesoría en el trabajo de investigación.

Al Dr. Roberto Mercado Hernández, por apoyarme una vez más académicamente y personalmente, gracias por escucharme y por sus consejos.

Al Dr. Francisco Iruegas Buentello, Dr. Feliciano Segovia Salinas, Dr. Jesús Montemayor Leal, miembros del comité de tesis por su asesoría y participación.

Al Dr. Fernando Jiménez Guzmán le doy las gracias muy especialmente por todo su apoyo desde que llegué a la U.A.N.L. y por sus consejos.

Al Dr. Narciso Salinas por su apoyo incondicional en el transcurso de mi paso por la U.A.N.L., hiciste mucho por mí siempre estaré agradecida †.

A mis compañeros de trabajo quiero darles las gracias muy especialmente ya que han representado un apoyo muy importante tanto profesionalmente como personalmente, gracias por acompañarme en esta etapa de mi vida; Ing. Luis Gerardo Mendoza Dávila, Dr. Cesar Guerrero Gámez †, Q.B.P. Rosa Nelly González, Q.B.P. Brenda Irasema Maldonado Meza, Q.B.P. Alejandro Martínez, Q.B.P. Edith Adriana Morales, Q.B.P. Belén Avila Montañez, MVZ Jaime Clodoaldo Martínez.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
APROBACIÓN DE LA TESIS OCTORAL	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
NOMENCLATURA	xv
1. RESUMEN	16
ABSTRACT	17
2. INTRODUCCIÓN	18
2.1 Justificación	20
2.2 Hipótesis	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos particulares	21
4. ANTECEDENTES	22
4.1 Clasificación taxonómica de la langosta Australiana <i>C. quadricarinatus</i> de acuerdo a (Martin y David, 2001)	22
4.2 Distribución de la familia Parastacidae	23
4.3 Riesgos y amenazas a la diversidad de acociles	23
4.4 Taxonomía y distribución geográfica de WSSV	26
4.5 Morfología de WSSV y sintomatología en los organismos	29
4.6 Severidad y hospederos	30
4.7 Diseminación de WSSV en América	32
4.8 Ensayos experimentales de infectividad	35

5. MATERIAL Y MÉTODOS	37
5.1 Prevalencia de WSSV en organismos de la especie <i>C. quadricarinatus</i> cultivados en granjas del estado de Tamaulipas	37
5.1.1 Monitoreo de la presencia de WSSV en <i>C. quadricarinatus</i> cultivado en granjas	38
5.1.2 Métodos de extracción de ADN viral	39
5.1.2 A High Pure PCR Template Preparation (Kit, Roche, Cat. 1796828)	39
5.1.2 B Extracción de ADN por fuffer de lisis (Kit IQ 2000)	40
5.1.3 Amplificación del ADN mediante la técnica de PCR	40
5.1.4 Electroforesis de los productos de PCR	42
5.1.4.1 Preparación de geles de poliacrilamida	43
5.1.4.2 Preparación de geles de agarosa	43
5.2 Análisis estadístico	43
5.3 Secuencia de un fragmento del virus, aislado del genoma de WSSV	44
5.3.1 Purificación de ADN viral a partir de un gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit)	44
5.3.2 Ligación, transformación y clonación del fragmento de ADN en el Vector TOPO pCR4 ^R -TOPO de 3954 pb	45
5.3.3 Selección y análisis de clonas TOPO10 positivas	45
5.3.4 Identificación de bacterias recombinantes mediante PCR con iniciadores específicos del fragmento clonado	45
5.3.5 Purificación del plásmido (Mini Prep. QIAGEN)	46
5.3.6 Análisis de secuencia	47
5.3.7 Protocolo de purificación en columnas Centri-Sep a partir de productos de PCR	48
5.3.8 Programación del equipo de secuenciación	49
5.4 Análisis y bioensayos para determinar la susceptibilidad de <i>C. quadricarinatus</i> al virus WSSV	50
5.4.1 Colección del material biológico	51
5.4.2 Confirmación de la presencia de WSSV	51

5.4.3 Purificación de WSSV en gradientes de sucrosa	51
5.4.4 Determinación de la dosis letal media L50 mediante ensayos Experimentales	52
5.4.5 Aplicación de la dosis letal media L50 a <i>C. quadricarinatus</i>	53
5.4.6 PCR en tiempo real	53
5.4.7 Selección de iniciadores para PCR en tiempo real	54
5.5 Análisis histopatológico	56
5.5.1 Técnica para la coloración de cortes infiltrados en parafina	56
6. RESULTADOS	58
6.1 Resultados de los muestreos de las granjas A y B	58
6.1.1 Resultados de las pruebas por PCR para la detección de WSSV	58
6.1.2 Resultados del segundo muestro de la granja A	59
6.1.3 Resultados del primer muestreo de la granja B	60
6.2 Prevalencia de WSSV en <i>C. quadricarinatus</i> en las granjas muestreadas	61
6.3 Purificación y clonación del fragmento de 401 pb (pertenece al gen VN1 de WSSV)	61
6.3.1 Ligación, transformación y clonación del producto purificado de 401 pb perteneciente a WSSV	62
6.3.2 Minipreps de WSSV 71-TOPO Seq y WSSV401-TOPO Seq	62
6.3.3 Digestión enzimática de ADN plasmídica con la enzima de restricción <i>Eco</i> R1	63
6.3.4 Resultado del análisis de secuencia de ADN viral obtenido de las muestras de <i>C. quadricarinatus</i>	64
6.4 Susceptibilidad de <i>C. quadricarinatus</i> a WSSV	66
6.4.1 Resultados de la cuantificación de WSSV purificado y pruebas por PCR punto final con los iniciadores blf/blr	66
6.4.2 Curva estándar para PCR en tiempo real	67
6.5 Resultados de las infecciones experimentales realizadas para Obtener la dosis letal media L50	68
6.5.1 Utilización de la L50 en pruebas infectivas de <i>C. quadricarinatus</i>	69

6.6 Histopatología del virus de la mancha blanca WSSV	72
7. DISCUSIONES	75
8. CONCLUSIONES	81
9. RECOMENDACIONES	82
10. LITERATURA CITADA	83
11. APÉNDICES	102
APÉNDICE A Preparación de soluciones (para 1 litro)	102
APÉNDICE B Preparación de células <i>E. coli</i> calciocompetentes	104
APÉNDICE C Secuencias reportadas en el banco de genes, incluye 401 recortado (secuencia encontrada) comparadas con el programa Clustal IV	106
APÉNDICE D Dosis letal media L50	109

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Eventos significantes en el campo de la patología del acocil a través del tiempo	25
2. Diagrama metodológico sobre la prevalencia de WSSV en <i>C. quadricarinatus</i>	37
3. Mezclas de reacción para PCR anidado (kit IQ2000)	40
4. Programas de termociclado para cada una de las reacciones de PCR	41
5. Mezcla de reacción y programa de termociclado para PCR con el kit de DiagXotics	42
6. Reacción de clonación TOPO	46
7. PCR para secuencia	48
8. Programa del equipo de secuenciación	49
9. Diagrama metodológico. Desglose de la metodología utilizada para los análisis y bioensayos de laboratorio	50
10. Registro de las 5 dosis probadas en 10 organismos cada una	52
11. Registro de las características de los iniciadores de 69 pb, blf/blr	54
12. Mezcla de reacción con reactivos y programa de termociclado estándar para PCR	55
13. Mezcla de reacción y programa de termociclado utilizados para PCR en tiempo real	55
14. Secuencia encontrada, perteneciente al genoma de WSS	64
15. Porcentaje de homología y divergencia de la secuencia determinada comparada con secuencias reportadas en el banco de genes	65
16. Valores obtenidos de la curva estándar utilizando concentraciones diferentes de ADN	68
17. Registro de los resultados obtenidos; No. de animales	

	dosis probadas, mortalidades a los 30 días postinfección	68
18.	Resultados de las amplificaciones de las muestras provenientes de infecciones experimentales por PCR en tiempo real	71
19.	Reporte de los resultados de los Cts de las muestras probadas por PCR en tiempo real a tiempos determinados	72

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Vista de un ejemplar de <i>Cherax quadricarinatus</i> de granjas de Tamaulipas	22
2. Estanque de cultivo de acociles de la especie <i>C. quadricarinatus</i>	38
3. Toma de muestras de hemolinfa de acociles de la especie <i>C. quadricarinatus</i>	39
4. Vector de clonación pCR 8/GW TA Cloning Kit	46
5. Equipo 3100 Avant Genetic Analyzer ABI PRISM de Aplid Biosystems	49
6. Bioensayos con <i>C. quadricarinatus</i> . Dosis infectivas	53
7. Gel de agarosa de los extractos de ADN	58
8. Electroforesis de productos de PCR del primer muestreo de la granja A	59
9. Electroforesis de productos de PCR del segundo muestreo de la Granja A	60
10. Electroforesis de productos de PCR del primer muestreo de la granja B	60
11. Electroforesis de las purificaciones de los productos de PCR del virus y del hospedero	61
12. Purificaciones de ADN plasmídico	62
13. Digestión enzimática de ADN plasmídico	63
14. Ejemplar de la especie <i>P. clarkii</i> utilizado como reservorio de WSSV	66
15. Muestras positivas para WSSV por PCR punto final	67
16. A Curvas de amplificación. Diluciones seriadas por duplicado	67
16. B Curva estándar de PCR en tiempo real	67
17. Análisis Probit. Probabilidad vs Dosis de infecciones experimentales	69

18.	Muestras positivas de WSSV obtenidas de infecciones	70
19.	Muestras provenientes de Infecciones experimentales con WSSV en <i>C. quadricarinatus</i>	70
20.	Curvas de amplificación de muestras procedentes de infecciones experimentales	72
21. A	Corte de branquias de <i>C. quadricarinatus</i> infectadas con	73
21. B	Corte histológico de tejido muscular de <i>C. quadricarinatus</i>	73
22.	Células infectadas con WSSV	74

NOMENCLATURA

%	por ciento
~	aproximadamente
≥	mayor o igual
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
buffer	amortiguador
cm	centímetro
com. pers.	comunicación personal
dNTP's	desoxinucleótidos trifosforados
<i>et al.</i>	abreviación latina proveniente de <i>et alii</i> que significa y otros
EUA	Estados Unidos de América
g	gramo
GC	guaninas-citocinas
GEN BANK	en español banco de genes
h	hora
H&E	Hematoxilina y Eosina
ICTV	International Committee on Taxonomy of Virus (siglas en inglés)
ID	identificación
<i>in situ</i>	en medio natural
<i>in vitro</i>	artificialmente
L50	dosis letal media
MET	Microscopio Electrónico de Transmisión
mg	miligramo
mg/ml	miligramos por mililitro

MgCl ₂	cloruro de magnesio
min	minuto
ml	mililitro
NCBI	National Center for Biotechnology Information (siglas en ingles)
ng/μl	nanogramos por microlitro
nm	nanómetro
No.	número
°C	grado centígrado
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
°T	Temperatura
pb	pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction (siglas en inglés)
pH	potencial hidrógeno
	rpm revoluciones por minuto
SE	sureste
seg	segundo
Taq.	<i>Termus aquaticus</i>
U	unidades
vs	contra
WSSV	White spot syndrome virus (siglas en inglés)
xg	gravedades
YHV	Yellow head virus (siglas en ingles)
μl	microlitro
μm	micrómetro

1. RESUMEN

El virus de la mancha blanca (WSSV) ha afectado severamente cultivos de camarón a través de Asia desde inicios de los 90s y en América a finales. La enfermedad está listada en la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), en una granja de cultivo puede causar hasta el 100% de mortalidad en camarones peneidos en 3-5 días desde la primera observación de animales con signos clínicos. La infección es común en productos comerciales de camarón a causa de su alta prevalencia en las áreas de mayor producción, en ambos; camarón de granja y silvestre. Además el virus puede permanecer por largos periodos en tejidos congelados. El objetivo de la investigación fue la determinación de la prevalencia y susceptibilidad al virus de la mancha blanca en el acocil exótico *Cherax quadricarinatus* en granjas de cultivo del noreste de México. En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de WSSV en poblaciones de acociles cultivados de la especie *Cherax quadricarinatus* en la República Mexicana. En muestras de hemolinfa, se realizaron pruebas de PCR por medio de las cuales se encontraron organismos positivos de *Cherax quadricarinatus* de una granja. La prevalencia se determinó por muestreos aleatorios en 2 granjas del Estado de Tamaulipas, para las dos granjas la prevalencia fue de un 15%. La susceptibilidad se evaluó mediante infecciones experimentales con el virus purificado en gradientes de sucrosa, la dosis letal media fue $L_{50} = 23.776 \text{ ng}/\mu\text{l}$ con organismos de 18 gramos de peso en promedio, a los 30 días postinfección. Para determinar la carga viral, mediante PCR tiempo real, las muestras fueron infectadas experimentalmente, con la dosis L_{50} a diferentes períodos de tiempo, se analizaron mediante PCR tiempo real y punto final en los cuales se obtuvo resultados muy similares. Con la finalidad de conocer relaciones filogenéticas sobre la cepa de virus encontrada, se clonó en el sistema *Escherichia coli* un fragmento de 401 pares de bases (pb) obtenido de las muestras positivas. Del fragmento clonado se secuenció 270 pb pertenecientes al gen vn1, el cual se comparó con lo reportado en el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) del virus de la mancha blanca.

ABSTRACT

White Spot Syndrome Virus (WSSV) is recorded since 90s as a virus that affected the penaeid shrimp culture at Asia and America. Have affected hardly shrimp cultured throughout Asia since early 90s in America latest 90s. The Office International of Epizootic mentioned that WSSV is a potential virus that can caused 100% mortality in shrimps of commercial farms in 3-5 days since first animal detected within clinic sintoms from disease. It's known the infection like common in commercial products of shrimp due high prevalence in areas with higher production, both cultured shrimp and wild. Also virus can stay long period in frozen tissue. The objective of this investigation was the evaluation of prevalence and susceptibility to white spot syndrome virus on exotic crayfish *Cherax quadricarinatus* in cultured farms from northest of México. This work report first time presence of WSSV in population of cultured acocils *Cherax quadricarinatus* in Republic Mexican. Prevalence was determinate performing random sampling organisms in two farms of Tamaulipas state using PCR probes finding positives organism in only one tank in a farm. Susceptibility was performing doing experimental infection with virus. Prevalence was evaluated from WSSV in *C. quadricarinatus*. A fragment of 401 pb (from positives samples) was cloned and a fragment of 270 pb of this was sequenced. The analysis of the fragment of 270 pb indicated that correspond to vn1 gene reported in the gene bank NCBI. The value of LD50 was 23.777 ng/µl for specimens of 18 g exposed at 30 post-infection days. The viral charge was determinate using PCR real time in purified virus with sucrose gradients.

2. INTRODUCCIÓN

La diversidad de acociles está constituida por 29 géneros y 623 especies, en las cuales están incluidas 18 subespecies, 439 son americanas y 49 endémicas de México (Hobbs Jr., 1989; Crandall, 1999; Fetzner, 2008). Estas especies se incluyen en 3 familias: Astacidae, Parastacidae y Cambaridae (Taylor *et al.*, 1996; Taylor, 2002). La familia Cambaridae está integrada por 12 géneros, y es la más diversa del mundo, el 99 % de sus especies están en Norteamérica (Taylor, 2002). La mayoría exhiben una distribución circuntemplada y son habitantes naturales de los ecosistemas dulceacuícolas en casi todos los continentes con excepción en África y la Antártica (Hobbs, 1988; Taylor *et al.* 1996). Las especies tropicales habitan en el norte de Australia y Nueva Guinea, este de México, Madagascar y Cuba (Taylor, 2002). El 77 % de las especies se encuentran en Norteamérica, 20% en Australia, 1.5% en América del Sur y 1.5% en Europa (Taylor, 2002). Los cambaridos americanos ocupan casi toda la parte sureste de Estados Unidos de América, además desde las montañas rocallosas hasta la vertiente Atlántica, y siguiendo por todo el territorio mexicano y la parte de Centroamérica y Cuba (Hobbs, 1984). Los cambaridos americanos comprenden los géneros: *Procambarus*, *Cambarus*, *Cambarellus*, *Orconectes* y *Troglocambarus* (Villalobos, 1955; Hobbs, 1984). En México, residen 54 especies nativas de acociles, pertenecientes a dos géneros: *Procambarus*, con 45, y *Cambarellus*, con nueve especies, que se distribuyen principalmente en la vertiente del Golfo de México, con algunos representantes en la región centro-occidental del país. Se ha documentado la existencia de tres especies consideradas exóticas para México como el *Procambarus clarkii*, *Orconectes virilis* y *Cherax quadricarinatus* (Campos y Contreras-Balderas, 1985; Rodríguez Almaraz y Campos, 1994; Rodríguez Almaraz y Mendoza Alfaro, 1999; Bortolini *et al.* 2007; Rodríguez Almaraz y Muñoz-Martínez, 2008; Mendoza-Alfaro *et al.*, 2011; Torres y Alvarez, 2011), todas ellas son consideradas de afinidad neártica (Villalobos-Hiriart *et al.*, 1993).

El acocil australiano *Cherax quadricarinatus* fue introducido a la República Mexicana en 1995 a la planta de acuicultura experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana de la ciudad de México, con fines de realizar cultivos experimentales. Posteriormente, esta especie fue reintroducida para establecer cultivos comerciales, en el cual se han producido cantidades moderadas para el mercado local, en los estados de Colima, Distrito Federal, Morelos, Jalisco, Tamaulipas y Yucatán. *C. quadricarinatus* también llamado langosta Australiana de pinzas rojas presenta varias ventajas con respecto a otras especies de acociles; puede pesar hasta 400 gramos en su medio natural de origen, aunque en cautiverio alcanza entre 30 y 150 gramos de producción rentable, su producción en carne es de 50-60% de su peso corporal, se reproduce durante el año de vida y tiene varios desoves si se mantiene la temperatura arriba de los 20°C (Dirección General de Acuicultura, 2002). Su fecundidad es alta comparada con otros organismos de su misma familia, carece de hábitos excavadores y tiene amplia resistencia a las condiciones limitantes en cautiverio, carece de conducta agresiva aunque suele mostrar canibalismo en sus primeros ciclos de vida, posee amplias posibilidades de cultivo rentable por los precios que alcanza en el mercado y muestra alta potencialidad para acuicultura, con alto crecimiento y sobrevivencia. (Dirección General de Acuicultura, 2002).

En este trabajo de investigación se registra por primera vez a WSSV infectando naturalmente a *C. quadricarinatus* cultivado en granjas, debido al impacto negativo que puede causar la presencia de este virus en crustáceos acuáticos, se justifica la implantación de una metodología integral y sistemática, que permita establecer técnicas certeras de diagnóstico para determinar los factores epizootiológicos detonantes que favorecen la presencia de mortalidades en masa de organismos cultivados y que pueden alterar la ecología de otras especies cohabitantes.

2.1 Justificación

Cherax quadricarinatus está considerada como una especie de acocil exótico e invasivo en México y otras partes del mundo, que es capaz de desplazar de su hábitat a otras especies, por lo que es de suma importancia conocer aspectos ecológicos y de sanidad.

Las epizootias que se presentan en los cultivos de crustáceos, tanto marinos como de agua dulce, ocasionan severas pérdidas económicas y son provocadas principalmente por enfermedades virales.

El virus de la mancha blanca ha causado mortalidades importantes en el país en poblaciones de camarones de agua salada en las costas de Sinaloa y Sonora.

Por este motivo es necesario realizar monitoreos sanitarios, para la implementación de un buen manejo de la sanidad acuícola en los cultivos y buenas prácticas de producción, por los especialistas. Las epizootias que se presentan en los cultivos de crustáceos podrían ser prevenidas aplicando dichas actividades.

2.2 Hipótesis

Los crustáceos decápodos no peneidos son susceptibles a ser infectados y es un reservorio natural del virus de la mancha blanca. Por lo tanto, *Cherax quadricarinatus* que se cultiva en granjas del noreste de México, también es susceptible a este virus.

En bioensayos de laboratorio con adultos de *Cherax quadricarinatus* se lograra una infección experimental, que se comprobara con las técnicas de PCR punto final y PCR tiempo real.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia y susceptibilidad del virus de la mancha blanca (WSSV) en el acócil exótico *Cherax quadricarinatus* cultivado en granjas de Tamaulipas.

3.2 Objetivos particulares

Determinar la prevalencia del virus de la mancha blanca WSSV en *Cherax quadricarinatus* en base a muestreos aleatorios y análisis de PCR.

Evaluar la dosis letal media L50 de WSSV en ensayos infectivos experimentales en *Cherax quadricarinatus* a partir de camarones del género *Litopenaeus* sp. provenientes de epizootias.

Implementar una técnica de PCR Tiempo Real para la cuantificación del virus de la mancha blanca.

Comparar la infección por medio de PCR tiempo real y PCR punto final.

Interpretar daño celular mediante análisis de cortes histológicos de *Cherax quadricarinatus* infectado experimentalmente.

4. ANTECEDENTES

4.1 Clasificación taxonómica de la langosta Australiana *C. quadricarinatus* de acuerdo a (Martin y Davis, 2001)

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Malacostraca

Orden: Decapoda

Suborden: Pleocyemata

Infraorden: Astacidea

Superfamilia: Parastacoidea

Familia: Parastacidae

Género: *Cherax*

Especie: *Cherax quadricarinatus*



Figura 1.- Vista de un ejemplar de *Cherax quadricarinatus* de granjas de Tamaulipas.

4.2. Distribución de la familia Parastacidae

De las 3 familias de acociles conocidas, Astacidae y Cambaridae se distribuyen en el norte y centro América, noroeste de Asia y Europa, mientras Parastacidae está limitada al hemisferio sur (Australia, Madagascar y Sudamérica).

4.3. Riesgos y amenazas a la diversidad de acociles

Hay un estimado de que más de la mitad de la población de acociles de Norteamérica está en declive o extinción (Taylor 2002). Los factores asociados a este declive son pérdidas de hábitat y degradación, sobrepoblación y la introducción de especies no nativas. En Europa, el factor más importante es la traslocación del hongo *Aphanomyces astaci* que portan especies de Norteamérica como una infección subclínica, pero es patogénicamente aguda a especies nativas de Europa (Alderman y Polglase, 1988). La plaga del acocil, la enfermedad causada por *A. astaci*, es quizá el caso más citado de incursión de enfermedades exóticas de animales acuáticos, como resultado de la significancia ecológica y socioeconómica de acociles de agua dulce y la severidad y longevidad de la plaga panzootica. Las poblaciones de todas las especies de acociles nativos de Europa han sido afectadas en los últimos 150 años. La plaga panzootica fue uno de los 29 casos de acuerdo a Lafferty y Gerber (2002) consideraron para concluir que los patógenos son un factor para aumentar el interés por la conservación.

La primera infección viral de crustáceos fue reportada por (Vago, 1966). Sin embargo, la primera infección en una población natural de camarones no fue reportada hasta 25 años más tarde (Anderson y Prior 1992). Encontraron que un virus baciliforme intramuscular afectaba al 100% de la población de *A. astacus* examinados de 4 poblaciones y 53.3 % de otra población de Finlandia central. La mayor prevalencia del virus baciliforme (AaBV) en *A. astacus* fue confirmada por inspecciones similares en años posteriores (Passonen *et al.* 1999). Un segundo virus baciliforme intracelular fue encontrado en asociación con una epizootia que resultó en la extirpación de una población de *A. pallipes* en el sur de Francia (Edgerton *et al.* 2002). Una pequeña escala de inspección demostró que los virus eran comunes

en otras tres poblaciones. Los virus infectaron el 100% de dos poblaciones y el 73.3% de otra población (Edgerton 2003).

Hay un consenso general que la primera epizootia de la plaga de acocil ocurrió en Po Valley en Italia en los 1860s, para comienzos de 1900s las epizootias han afectado a las poblaciones de acociles en la mayor parte de Europa central, norte y este Alderman y Polglase (1988).

Desde los 80s debido a la ocurrencia del incremento de los cultivos intensivos o semi-intensivos de acociles predominantemente de especies nativas de Australia, se ha llevado a cabo el monitoreo más extenso del estatus de enfermedades de estos organismos. Como resultado muchos patógenos potenciales de acociles Australianos han sido reportados en el período de intervención, incluyendo virus, bacterias, organismos parecidos a rickettsias y endoparásitos ciliados. (Edgerton 2002^a; Evans y Edgerton 2002).

Los virus son comunes, patógenos severos de animales acuáticos. De las 35 enfermedades de especies de animales acuáticos listados por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), 16 son causadas por virus. El virus de la mancha blanca (WSSV) ha sido panzootico en cultivos de camarón a través de Asia desde inicios de los 90s y en Sudamérica desde finales de los 90s, en una granja de cultivo, WSSV típicamente causa el 100% de mortalidad en camarones peneidos en 3-5 días desde la primera observación de animales con signos clínicos de la enfermedad de la mancha blanca. Se sabe que la infección por WSSV es común en productos comerciales de camarón a causa de su alta prevalencia en las áreas de mayor producción, tanto en camarón de granja y silvestre (Lo y Kou 1998). Más aún mancha blanca puede permanecer por largos periodos en tejidos congelados (Nunan *et al.* 1998).

En acociles la primera infección viral a causa de WSSV fue reportada por (Richman *et al.* 1997), quién descubrió que el virus fue la causa de epizootias, con hasta un 90% de mortalidad en *Procambarus* sp. y *Orconectes punctimanus* ubicados en el Zoológico Nacional en Baltimore, Maryland (U.S.A). La vía de transporte del virus fue camarones congelados los cuales fueron alimentados con

harinas de camarones antes de ser cosechados y embarcados a Baltimore (Lightner *et al.* 1997).

Recientemente, Baumgartner *et al.* (2009) demostraron que ambos *P. clarkii* y *Procambarus zonangulus* en Louisiana, fueron hospederos naturales de WSSV.

Infecciones experimentales han probado el potencial de la mancha blanca para causar serias mortalidades en acociles de las tres familias (Wang *et al.* 1998; Shi *et al.* 2000; Corbel *et al.* 2001; Jiravanichpaisal *et al.* 2001; Edgerton, 2004). Significativamente de los 29 casos que causaron enfermedades en acociles, considerados por Lafferty y Gerber (2002) en los cuales enfermedades infecciosas han influenciado a especies de hospederos de interés, el mayor número de casos involucra a virus.

En la siguiente tabla se describen los eventos significativos registrados a través del tiempo con relación a las enfermedades encontradas en acociles de diferentes especies.

Tabla 1.- Eventos significantes en el campo de la patología de crustáceos de interés ecológico y económico a través del tiempo (Edgerton, 2004).

Año	Suceso
1857	Se reportó <i>Psorospermium hsecheli</i> en acociles Europeos
1860	Primera aparición de la plaga de acociles <i>A. astaci</i>
1892	Primer reporte de microsporidios en acociles Europeos (<i>Thelohania contejeani</i>)
1898	Especulación de que la plaga de acocil era una bacteremia
1920	Aceptación de <i>A. astaci</i> como el agente etiológico de la plaga de acociles
1934	<i>A. astaci</i> confirmado como causa de la plaga de acocil
1960	Estudios de infecciones bacteriales en acociles Europeos
1965	Primer reporte de microsporidios en acociles americanos
1979	Primer reporte de microsporidios en acociles Australianos
1986	Primer reporte del organismo <i>Nocardia</i> en acocil
1987	Primer reporte de <i>Psorospermium</i> sp. en acociles de Australia
1991	Primer reporte de organismo parecido a rickettsia en acocil, vibriosis

	en acociles Americanos, <i>Saprolegnia</i> parasítica reportada de acociles de agua dulce.
1992	Primer reporte de infección viral en acociles
1993	<i>Tichosporon beigelii</i> (hongo patógeno) reportado, primer reporte de infección viral en acociles introducidos a Estados Unidos.
1994	Vibriosis en acociles Australianos
1995	Primer reporte de infección viral en camarones Americanos nativos
1996	Primer reporte de infección viral en acociles Europeos.
1997	WSSV en acociles Americanos en el Parque Zoológico Nacional.
2004	Incremento de brotes epizooticos relacionados a <i>A. astasi</i> y epizootias en acociles Americanos nativos.

4.4 Taxonomía y distribución geográfica de WSSV

El virus WSSV inicialmente fue nombrado White Spot Baculovirus WSBV y clasificado en el género NOB (Non-Occluded Baculovirus), dentro de la subfamilia Nudivaculovirinae de la familia Baculoviridae, según el quinto registro del ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (Francki *et al.* 1991). Sin embargo, en el sexto registro de la ICTV la subfamilia y el género, no se agregan a la lista, quedando como virus de invertebrados sin asignación (Murphy *et al.* 1995).

El virus de la mancha blanca es un virus de ADN de doble cadena ubicado en la familia Nimaviridae la cual afecta un rango amplio de crustáceos hospederos, incluyendo acociles de río (Stentiford *et al.*, 2009). Los viriones son helicoidales en forma de varilla, rodeados por una envoltura trilaminar y medidas de 80- 120 x 250- 380 nm.

Otros nombres que le han sido asignados son: Baculovirus de la necrosis hipodérmica y hematopoiética (IHHNBV), causante de la enfermedad epidérmica explosiva del camarón marino ocurrida en 1993-1994 en China, (Huang *et al.* 1994; Cai *et al.* 1995), es un virus en forma de varilla de *Penaeus japonicus* (Inouye *et al.* 1994; Takahashi *et al.* 1994). Baculovirus sistémico ectodérmico y mesodérmico (SEMBV) del camarón tigre *Penaeus monodon* de Tailandia (Wongteerasupaya *et al.* 1995) y Baculovirus de la mancha blanca (WSBV), asignado por (Wang *et al.* 1995 y Lo *et al.* 1996).

Los agentes virales de WSBV son muy similares en tamaño (80 a 120 x 275 a 360 nm), rango geográfico, signos macroscópicos y microscópicos, por lo cual, las enfermedades causadas por estos baculovirus no ocluidos se agrupan junto con los diversos miembros del grupo WSBV, bajo el nombre de síndrome de la mancha blanca (WSS), de acuerdo a la recomendación de Lightner (1996).

La enfermedad viral más reciente en América es la denominada WSSV, aunque el origen de ésta fue Asia. El síndrome es causado por al menos cinco tipos diferentes de virus que constituyen el complejo WSSV, los cuales son muy similares en el cuadro clínico, morfología al microscopio electrónico de transmisión, histopatología e histotropismo.

En el Hemisferio Oriental WSSV ocasionó efectos devastadores en 1992 en camarones cultivados. Las especies *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Fe indicus*, *Fe. penicillatus* y *Marsupenaeus japonicus*, fueron las principales especies infectadas naturalmente con el virus en los países asiáticos. Algunos ejemplares mostraron manchas blancas en la superficie interna del exoesqueleto y la mortalidad acumulativa alcanzó el 100 % después de la aparición de los signos clínicos (Chen, 1995, Kasornchandra y Boonyaratpalin, 1996).

Las primeras observaciones de este complejo viral fueron realizadas en granjas camaronícolas de Japón, donde la mortalidad en los cultivos de *Marsupenaeus japonicus* alcanzó más del 80% (0.01-22.5 g). Los camarones moribundos desarrollaron un color anormal rosado, además de manchas blancas en el cuerpo (Nakano *et al.* 1994; Takahashi *et al.* 1994, Inouye *et al.* 1994) identificó al agente causal como virus, no ocluidos, en forma de varilla, con envoltura, localizados en los núcleos de las células del epitelio cuticular del estómago y células linfoides de especímenes de la especie *Ma. japonicus* moribundos a lo cual llamó RV-PJ (en Inglés rod shaped nuclear virus of *P. japonicus*), ubicándolo en Baculoviridae o Polydnviridae.

En 1994, sucedió otro brote de enfermedad que causó serias mortalidades en el camarón tigre *P. monodon*, cultivado en Tailandia. La sintomatología en los organismos enfermos fue una coloración rosa o rojiza del cuerpo, con manchas blancas en el interior del exoesqueleto en el cefalotórax. Las observaciones al microscopio electrónico de transmisión (MET) mostraron viriones cilíndricos o elipsoidales (Asian Shrimp Culture Council 1994). Wongteerasupaya *et al.* (1995)

denominaron informalmente SEMBV (Baculovirus ectodérmico y mesodérmico sistémico) por el origen de los tejidos infectados, perteneciente al género Non-occluded baculovirus (NOB). Las características patológicas de éste, son la necrosis en tejidos derivados de ecto y mesodermo, pero sin la formación de los cuerpos de inclusión Cowdry tipo A. Los viriones de SEMBV miden 276 ± 121 nm, nucleoclápside de los viriones completos de 201 ± 89 nm, cápsides vacías de 302 ± 85 nm.

Inouye *et al.* (1996) describen mortalidades en masa del camarón kuruma *Ma japonicus*. El agente etiológico lo describen como viriones de forma oval, con una nucleocápside cilíndrica parcialmente lenticular, de 86×363 nm dentro de una envoltura. El virion maduro de 404×152 nm. El genoma viral fue identificado como ADN no segmentado de doble cadena, aproximadamente de 163 kilopares de bases. Con esta base, sugiere que sea ordenado dentro de los Baculoviridae, subfamilia Nudivaculovirinae. Redesigna al virus como PRDV (Penaeid rod-shaped DNA virus, anteriormente RV-PJ) y sugieren denominar a la enfermedad PAV (viremia aguda de los peneidos).

(Takahashi *et al.* 1996) consideran que RV-PJ fue importada por Japón, originalmente de una población de *Ma japonicus* de China, desarrollaron un estudio para purificar y amplificar un fragmento de ADN del RV-PJ y aplicar la técnica de PCR para el diagnóstico no solo de RV-PJ en *Ma japonicus*, sino también para el SEMBV de *P. monodon*, debido a que estas enfermedades presentan signos clínicos similares causados por un virus baciliforme, no ocluidos, ocasionando serias pérdidas económicas en los cultivos asiáticos. Purificaron partículas virales a partir de tejidos infectados con RV-PJ y por separado, con SEMBV. Extrajo el ADN genómico y efectuó digestiones con Eco RI/Hind III. Insertando los fragmentos en el sitio Eco RI/Hind III del plásmido pGEM 3zf (+) y con los plásmidos recombinantes transforma *Escherichia coli* XL1-BlueMRF además empleó la clona Pjb79, con un inserto de 889 pb para diseñar un par de iniciadores. De acuerdo a la secuenciación realizada y a las reacciones de prueba, el producto amplificado mide 643 pb. Los iniciadores diseñados fueron probados con tejido del órgano linfoide infectado con RV-PJ y SEMBV, los cuales sirvieron como templado, concluyendo que ambos están estrechamente relacionados, además de que causan el mismo cuadro clínico,

compartiendo órganos blanco e histopatología, excepto por la formación de cuerpos de inclusión.

Un integrante más del complejo, denominado baculovirus asociado al síndrome de la mancha blanca (WSBV) fue aislado del camarón tigre *P. monodon*. Esta cepa se utilizó para desarrollar una herramienta diagnóstica por Lo *et al.* (1996) para la detección del WSBV y otros agentes infecciosos relacionados, purificaron los viriones y extrajeron el ADN para la construcción de bibliotecas genómicas. Diseñaron dos pares de iniciadores específicos, con los cuales amplifican productos de 1447 pb y un segundo producto de 941 pb. Consideran que este estudio constituye una buena herramienta para estudios comparativos de otros baculovirus no ocluidos, tales como el RV-PJ de Japón; HHNBV de China; SEMBV de Tailandia y WSBV de Taiwan, emplearon iniciadores específicos para amplificar el ADN genómico del camarón para monitorear la contaminación del ADN de camarón en las preparaciones de ADN genómicas de WSBV. Con este objetivo diseñaron un par de iniciadores a partir de una región altamente conservada de la secuencia 18 S RNA de los decápodos, basada en las secuencias publicadas por (Kim y Abele (1990). Con estos iniciadores el ADN de camarón produjo un producto de PCR de 848 pb, correspondiente a las secuencias 352– 1200 de la subunidad 18 S rRNA de *Farfantepenaeus aztecus*.

4.5 Morfología de WSSV y sintomatología del hospedero

Park y Lee (1996) estudiaron una enfermedad masiva ocurrida en *Penaeus orientalis* y *Farfantepenaeus chinensis* cultivados en Corea. Las características patológicas de esta enfermedad, en infecciones naturales y experimentales, fue la coloración rojiza del cuerpo y manchas blancas en el interior del caparazón. Histopatológicamente se observó necrosis del órgano linfoide, degeneración y necrosis del epitelio epidémico e intestino anterior, con los cuerpos de inclusión amofílicos a basofílicos en epitelio y branquias. Al microscopio electrónico de transmisión se observaron partículas virales con envoltura, no ocluidas, en forma elipsoidal o de varilla, en el interior de los núcleos de células linfoides e intersticiales del hepatopáncreas. El tamaño de los viriones fue de 375 x 167 nm y la

nucleocápside 290 x 75 nm. Consideraron que el agente etiológico estudiado en casos de Corea es similar a los baculovirus asociados con el síndrome de la mancha blanca (WSBV) ocurridos en Taiwan.

El histotropismo de la infección por WSBV en hospederos silvestres, *P. monodon* fue analizado por Lo *et al.* (1997) en 16 partes disectadas: pleópodos, branquias, estómago, músculo abdominal, hemolinfa, intestino medio, corazón, pereiópodos, órgano linfoide, integumento, tejido nervioso, hepatopáncreas, testículos, ovario, espermátóforos y tallo ocular. En todos los tejidos y órganos estudiados se observó replicación viral. Por primera vez, los estudios de hibridación *in situ* y microscopía electrónica de transmisión (MET) mostraron evidencia del WSBV en órganos reproductores. Sin embargo, no observan huevos maduros infectados, considerando que estos fueron eliminados por el virus antes de la maduración.

En 1998 se reportó un brote epizootico viral en cultivos de *Fe chinensis* de Corea. El agente causal se identificó como un virus similar al WSSV de Taiwan, con base en los signos clínicos y a la morfología viral al MET (375 x 167 nm y la nucleocápside de 290 x 75). Consideraron que este difería morfológicamente al RV-PJ estudiado en Japón. Sin embargo, sintetizaron iniciadores para separar un producto de PCR de 643 pb con una secuencia idéntica a la de RV-PJ. Concluyendo que el agente Coreano combina características de WSSV y RV-PJ.

4.6 Severidad y hospederos

Uno de los principales portadores silvestres de WSSV es *Macrobrachium rosenbergii*, fue estudiado por Peng *et al.* (1998), quienes observaron las manchas blancas en el exoesqueleto, y seleccionaron ejemplares infectados en forma natural por PCR. Los productos amplificados fueron similares a los de *P. monodon* y la comparación de los perfiles de restricción con *Hae* III, *Hpa* II, *Rsa* I y *Sau* 3 A1, no revelaron diferencias. Un homogeneizado de los tejidos infectados de *P. monodon* fueron inoculados a larvas y postlarvas de *M. rosenbergii* sanos. Después de dos días, algunos de los especímenes muertos fueron positivos para WSBV.

Otros hospederos silvestres estudiados, pero negativos a la infección por WSSV son *Exopalemon orientalis*, *Trachypenaeus curvirostris*, *P. merguiensis*, *Macrobrachium* sp y *Procambarus clarkii*. Las jaibas *Calappa lophos*, *Portunus*

sanguinolentus, *Charybdis granulata* y *C. feriata* tampoco presentaron infección natural, al igual que las langostas *Panulirus ornatus*, *P. versicolor*, *P. longipes* y *P. penicillatus*, colectadas de las costas de Taiwan. Al inicio los casos positivos de WSSV fueron detectados en camarones marinos de las cuatro especies mayores de cultivo, *P. monodon*, *Ma japonicus*, *Fe penicillatus* y *Metapenaeus ensis* (Wang *et al.* 1998), sin embargo en el laboratorio se ha demostrado la capacidad de los cangrejos *Scylla serrata*, *Sesarma* sp y *Uca pugilator* como portadoras del WSSV. Kanchanaphum *et al.* (1998) infectaron experimentalmente a estos hospederos manteniendo la infección viral hasta por 45 días sin que desarrollaran un cuadro clínico de la enfermedad. Todas ellas transfirieron la enfermedad vía agua a *P. monodon*. Estos estudios demuestran que los cangrejos son un problema real en los sistemas de cultivo. Otros reservorios potenciales que han sido identificados mediante estudios experimentales son la jaiba de la arena *Portunus pelagicus*, *Scylla serrata* y el krill *Acetes* sp., los cuales son capaces de transportar el agente infeccioso y persistir por largos periodos en el medio ambiente de las granjas camaronícolas (Supamattaya *et al.* 1998).

Debido a la diversidad de aislados que se reportan de WSSV, Kasornchandra *et al.* (1998) analizaron aislados virales de epizootias ocurridas en seis diferentes países por histología, MET y PCR. Para aplicar la última técnica, diseñaron los iniciadores 102F1 y 102R1. Los cambios histopatológicos en su totalidad fueron similares, caracterizados por degeneración celular, hipertrofia nuclear y marginación de la cromatina en los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico, con la presencia de cuerpos de inclusión Cowdry, tipo A. Al MET se observa similitud en tamaño y morfometría de los seis diferentes aislados. Por PCR, los aislados de Indonesia, Tailandia y Malasia produjeron un producto amplificado de 520 pb, pero con los aislados de Japón, China e India se presentaron productos de peso molecular mayor a lo esperado. Por ello consideraron que probablemente se trate del mismo tipo de virus.

Sudha *et al.* (1998), registraron que había tres tipos diferentes de epizootias en la India, asociadas al WSSV en los cultivos de camarón *P. monodon* y *Fe indicus*. En el Tipo I (aguda o subaguda), con nivel de severidad de infección en tejidos moderada a alta, las mortalidades más significativas ocurrieron dentro de los primeros 7-10 días, y los camarones afectados presentaron manchas blancas en el caparazón como

principal signo clínico. En el Tipo II (preagudo), los camarones afectados mostraron coloración rosada, el nivel de severidad de los tejidos fue muy alto y las mortalidades en masa ocurrieron en los 2-3 días. El Tipo III (crónico) presentó baja severidad a los tejidos, con las manchas blancas o coloración rosada ausente. Las mortalidades se presentaron entre los 15 a 28 días, pero escasas. La forma preaguda fue más común en los juveniles, mientras que la forma aguda a subaguda y crónica fueron más comunes en los subadultos y adultos. Las formas agudas y subagudas se observaron en el 60 % de las epizootias., mientras que la forma crónica y preaguda se observaron en el 30 y 10 % de los brotes, respectivamente.

4.7 Diseminación de WSSV en América

Los primeros casos diagnosticados de WSSV en el Hemisferio Occidental, ocurrieron casi simultáneamente en octubre y diciembre de 1995 en granjas de *Litopenaeus setiferus* cultivados en Texas y Carolina del Sur, EUA (Frelief, PF, Dept. of Veterinary Pathobiology, The Texas Veterinary Medical Center, Texas A & M University, College Station, Texas, USA, com. pers.; Lightner, 1996). Mediante técnicas histopatológicas fue diagnosticado y posteriormente confirmado por hibridación y PCR (Nunan y Lightner 1997). El tercer caso de WSSV fue registrado en acociles como *P. clarkii*, *Orconectes punctimanus* y *Procambarus* spp., en el Zoológico Nacional en Washington, DC. (Lightner *et al.* 1997).

Debido al enorme impacto económico causado a la industria camaronícola Asiática, en el periodo de 1992 a 1998 y a los primeros focos epizoóticos ocurridos en los Estados Unidos de América, se realizaron inoculaciones experimentales con las cepas asiáticas del WSSV en peneidos americanos con el objeto de conocer el efecto patológico o bien, la susceptibilidad de estos hospederos a la infección. Durand *et al.* (1996) aislaron el agente de la enfermedad referida como WSS y WSBV infectando experimentalmente a *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* con un homogeneizado de *P. monodon* infectado proveniente de Tailandia. Al MET, los viriones midieron 350 nm de longitud y 130 de ancho. Las nucleocápsides oscilaron de 300 a 420 nm de longitud y 70-95 de ancho y muestran una superficie segmentada en la superficie, describieron también la presencia de partículas únicas que no habían sido observadas anteriormente y las nucleocápside fue de (400 x 120 nm), obtuvieron fragmentos de digestión con la enzima Eco RI

para efectuar la clonación de una parte del genoma. Caracterizaron cuatro de estos fragmentos y los utilizaron como sondas no radioactivas, etiquetándolas con Dig-11-dUTP. Las sondas así preparadas, hibridaron con el material localizado en los núcleos de los tejidos infectados, como son el tejido conectivo, tejido epitelial, músculo y tejido nervioso, incluyendo también, los hemocitos.

La presencia del virus asiático, WSSV, en Texas, EUA, plantea la incógnita de cómo se introdujo el virus al Hemisferio Occidental. La diseminación de virus exóticos históricamente se atribuye a la introducción de animales enfermos, como sementales, en áreas libres de infección; aves que actúan como vectores y transportan al agente infectivo; así como la importación y procesamiento de productos alimenticios congelados (United States Department of Commerce, 1997). El último mecanismo es el más importante, debido a los elevados volúmenes de alimento congelado, que son importados a los EUA. Este país, en 1995 importó 118 888 869 kg de camarón provenientes de seis exportadores asiáticos: China, India, Tailandia, Vietnam, Indonesia y Filipinas. De este volumen, el producto congelado, constituyó el 97 % de todo el camarón importado (United States Department of Commerce, 1997). El producto recibido, por lo común es re-empaquetado y procesado en las plantas situadas en las costas. Los desechos sólidos y líquidos de estas plantas son desechados al mar sin un tratamiento previo. De acuerdo a los análisis efectuados por Nunan *et al.* (1998), los ensayos de infectividad, MET y PCR, han demostrado que los virus WSSV y YHV son detectables e infecciosos en las importaciones de producto congelado.

Lightner *et al.* (1998) realizaron otros estudios en otras especies de peneidos americanos como hospederos experimentales de WSSV y YHV, utilizando postlarvas y juveniles de *Fa aztecus*, *Fa. duorarum*, *L. setiferus* y *L. vannamei* fueron inoculadas con tejidos infectados por los virus, provenientes de Asia. Los retos en las postlarvas de *L. setiferus* y *L. vannamei*, resultaron en infecciones severas, mientras que en *Fa aztecus* y *Fa duorarum* fueron menos severas. En los juveniles el virus WSSV causó mortalidad acumulativa del 100 % en *L. setiferus* y *L. vannamei*. En *Fa aztecus*, se determinó una infección moderada, con mortalidad acumulativa del 27 %. Sin embargo, en *Fa duorarum* no se presentaron signos de infección y la mortalidad acumulativa fue del 0 %. El YHV, en cambio, causó mortalidades severas en los juveniles de las cuatro especies. La virulencia de seis

aislados geográficos de WSSV en las postlarvas de *L. vannamei* y juveniles de *Fa duorarum* fue comparada por Wang *et al.* (1999) quienes reconocieron al WSSV como uno de los patógenos más importantes de camarón, extendiéndose en la mayoría de los países Asiáticos donde se cultiva el crustáceo, así como en el Golfo de México y el Sureste de los EUA. Compararon los aislados originarios de China, India, Tailandia, Texas, Carolina del Sur y el aislado de cangrejos cautivos del Zoológico Nacional de los EUA. En el estudio, los hospederos experimentales fueron inoculados con tejidos infectados. Las infecciones resultantes fueron confirmadas por histología. La mortalidad acumulativa de *L. vannamei* alcanzó el 100 % después del reto con cada una de los seis aislados geográficos de WSSV, en el cual, el aislado de Texas, sin embargo, causó mortalidad más rápida que los otros aislados. En un marcado contraste, la mortalidad acumulativa en *Fa duorarum* alcanzó del 35 al 60% con los diferentes aislados. En éste, el aislado de Texas fue también el más virulento. En conclusión, la virulencia varía entre cada aislado geográfico de WSSV y la susceptibilidad varía con la especie y estadio de los hospederos.

En el periodo de febrero a marzo de 1999, se registraron los últimos casos de epizootias de camarones marinos debido a WSSV en Nicaragua, Guatemala y Honduras. Los primeros registros se originaron en Honduras, a mediados de enero, observándose a los camarones con estrés y un cuadro parecido al síndrome de Taura. Lo inusual de este signo fue que el cultivo afectado en su mayoría fue *L. stylirostris*. Cabe señalar que el origen de la larva en los cultivos afectados era silvestre. Por su parte, la larva de laboratorio *L. vannamei* fue afectada en un grado mucho menor. Este reporte, constituye el primer registro del WSSV en las costas del Pacífico del Continente Americano, pues los registros anteriores estaban limitados a los organismos silvestres y cultivados del Golfo de México (Deli Group-Ecuador and Aquaculture Fonseca-Honduras, 1999).

Durand *et al.* (1997) reportaron la ultraestructura de un aislado tailandés de WSSV originario de *P. monodon*, inoculándolo en *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Al MET, los viriones fueron observados de forma cilíndrica, con una extensión apical de la envoltura, la nucleocápside cilíndrica, con extremos asimétricos y apariencia segmentada. Indicaron que la morfogénesis viral inicia con la formación de membranas de *novi* en el nucleoplasma y por la elaboración de túbulos largos, segmentados, vacíos. Estos túbulos se rompen después en fragmentos para formar las

nucleocápsides vacías, después de eso las membranas envuelven la cápside, dejando una extremidad abierta. Las nucleoproteínas, que tienen una apariencia filamentosa, entran a la cápside a través del extremo abierto, cuando el core está completamente formado, la envoltura se cierra en el extremo abierto y forma la cola apical del virión maduro.

4.8 Ensayos experimentales de infectividad

Transmisiones experimentales del virus en acociles de río, han sido demostradas usando hemolinfa de *Penaeus chinensis* infectando a *C. quadricarinatus*, por Shi *et al.* (2000), de *P. monodon* a *P. leniusculus* (Jiravanichpaisal *et al.*, 2001), de *P. monodon* a *Cherax destructor albidus* por Edgerton (2004), de rotíferos a *P. clarkii* posiblemente vía transmisión mecánica preferible a la transmisión biológica verdadera (Yan *et al.*, 2007), además Du *et al.* (2007) sugieren que la replicación del virus en *P. clarkii* es tan exitosa que puede ser usada como un método biológico para amplificar partículas virales para estudios subsecuentes.

Tang y Lightner (2001), investigaron la especificidad y sensibilidad de camarones peneidos a WSSV mediante inoculaciones con el virus y realizaron pruebas de PCR en tiempo real para determinar el monto de la infección. Así mismo desarrollaron RT-PCR en tiempo real para determinar síndrome de Taura (TSV) y virus de la cabeza amarilla (YHV). El ensayo de especificidad fue determinado usando virus como templado en un PCR en tiempo real. Los resultados dieron valores del Ct de 40 para ADN, otros baculovirus, (BP y MBV) y dos parvovirus de camarón (IHHNV, HPB). Los iniciadores reaccionan a varios aislados de WSSV (China, Sur de Carolina, Texas, India) y dieron señales fuertes de amplificación de estas muestras. El amplicón de WSSV de 69 pares de bases generado por PCR fue clonado y designado como pWSSV-1. Se determinó una sensibilidad de 4 copias cuando se usó una serie de concentraciones del estándar. Para estos experimentos se utilizaron juveniles de *P. stylirostris* en infecciones experimentales contenían 1.3×10^7 a 9×10^{10} copias de WSSV en las muestras de pleópodos. En *P. monodon* colectados de Indonesia también se detectó infección con niveles de 2.1×10^6 copias/g de DNA. Se analizaron varios tejidos infectados de *L. vannamei* para medir cantidades de WSSV, el resultado demostró que la hemolinfa contenía el mayor nivel de WSSV comparada con branquias y pleópodos.

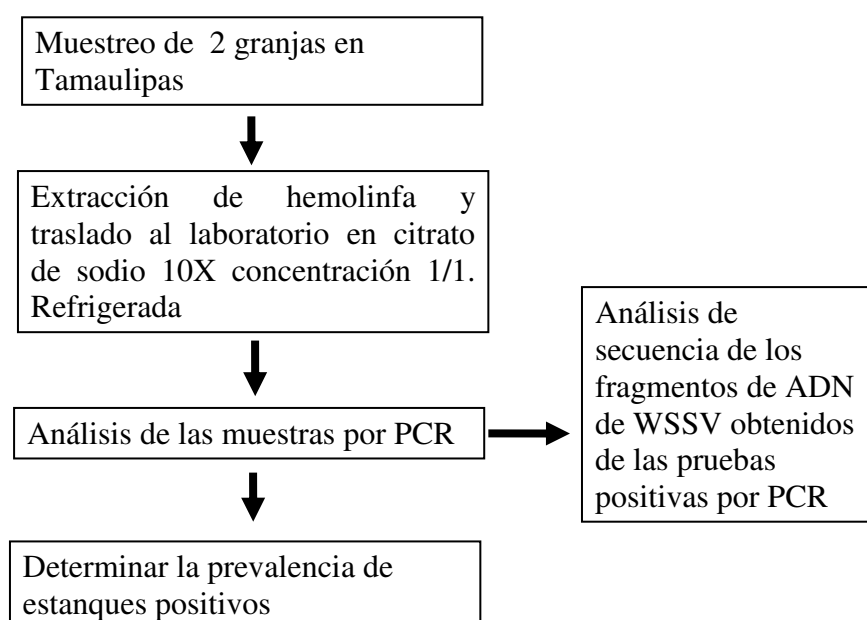
Unzueta *et al.* en (2003) estudiaron la susceptibilidad de *Litopenaeus schmitti* y *C. quadricarinatus* al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), utilizaron a *L. vannamei* como especie de referencia positiva para estas infecciones virales. Encontraron que la susceptibilidad fue significativamente mayor en *L. vannamei* que en *C. quadricarinatus*. En análisis histológico demostraron la presencia de los cuerpos de inclusión característicos de las infecciones con WSSV en las tres especies de crustáceos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Prevalencia de WSSV en organismos de la especie *C. quadricarinatus* cultivados en granjas del estado de Tamaulipas

En el siguiente diagrama metodológico para la prevalencia de WSSV en granjas de cultivo de *C. quadricarinatus* se describe la secuencia de la metodología utilizada en ésta fase de la investigación, que consistió en la búsqueda de organismos positivos para obtener la prevalencia del virus, y posteriormente se realizó trabajo de laboratorio sobre las muestras que resultaron positivas, hasta llegar a secuenciar el fragmento de ADN perteneciente al genoma viral mediante métodos moleculares.

Tabla 2.- Diagrama metodológico sobre la prevalencia de WSSV en *C. quadricarinatus*.



5.1.1 Monitoreo de la presencia de WSSV en *C. quadricarinatus* cultivado en granjas

Durante el 2007, se muestreó dos veces la granja de cultivo de *C. quadricarinatus* “A” y una vez la granja de cultivo “B”, con el fin de monitorear la presencia del WSSV en el acocil australiano en ambas granjas ubicadas en Tamaulipas. Para lograr este objetivo se monitoreo de 7 a 10 estanques seleccionados (5 estanques con cultivo de machos y 5 estanques con hembras) y en cada uno se recolectó 10 organismos con un peso promedio de 18 g (Fig. 2).



Figura 2.- Cultivo del acocil australiano *C. quadricarinatus* de una granja de Tamaulipas.

Los acociles exóticos fueron cosechados manualmente del fondo del estanque y dentro de los “barroblock” que se usan para proveer refugio a estos. A cada ejemplar se les extrajo hemolinfa *in situ* y se mezcló con citrato de sodio 10X, concentración 1/1. Estas muestras de hemolinfa se trasladaron en hieleras con hielo al laboratorio, para ser procesadas inmediatamente para lograr extracción del ADN.



Figura 3.- Toma de muestra de hemolinfa en acociles de la especie *C. quadricarinatus*.

5.1.2 Métodos de extracción de ADN viral utilizados para las pruebas por PCR.

5.1.2 A High Pure PCR Template preparation (Kit, Roche, Cat. 1796828).

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se depositaron 200 μ l del purificado viral y se adicionó una cantidad igual de amortiguador de unión y 40 μ l de proteinasa K, posteriormente se mezcló e incubó a 72 °C por 10 min. Posteriormente, se agregó 100 μ l de isopropanol, se homogeneizó y se vació al tubo filtro previamente ensamblado a su tubo colector, para ser centrifugado a 8,000 rpm., por 1 min. El filtrado fue descartado junto con su tubo colector y se ensambló uno nuevo para adicionarle 500 μ l de amortiguador inhibidor, se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min, se descartó el filtrado y el tubo colector, se ensambló uno nuevo para adicionarle 500 μ l de amortiguador de lavado, se centrifugó a 8,000 rpm., por 1 min (este paso se repitió una vez más). Para eliminar el amortiguador de lavado residual se centrifugó a 14,000 rpm, por 10 seg, y el tubo colector fue descartado y se colocó en un tubo de reacción para adicionar 50 μ l de amortiguador de elusión precalentado a 55 °C y centrifugado a 8,000 rpm por 1 min. El ADN diluido fue conservado a -20 °C, para su uso en las reacciones para PCR.

5.1.2 B Extracción de ADN por buffer de lisis. KIT IQ2000

Se colocó 200 µl de hemolinfa en un tubo de 1.5 ml. Se agregó 500 µl de buffer de lisis al tubo y se homogeneizó. Posteriormente la muestra fue incubada a 95°C por 10 minutos y centrifugada a 12000 g (12000 rpm r= 5-7 cm) por 10 minutos. Se utilizaron 200 µl de la solución clara de arriba fue transferida a un tubo nuevo de 1.5 ml con 400 µl de etanol 95%. Se mezcló y centrifugó a 12000 g por 5 minutos, fue decantado el etanol y secada la pastilla. Por último se disolvió la pastilla en agua bi destilada ddH₂O o en buffer TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 19 mM).

5.1.3 Amplificación del ADN mediante la técnica de PCR

Para el diagnóstico de WSSV por la técnica de PCR punto final para la detección de WSSV en condiciones de cultivo, se utilizaron iniciadores incluidos dentro de los kits utilizados (DiagXotics e IQ2000), en el caso de PCR en tiempo real se utilizó los iniciadores de 69 pb (Tang y Lightner, 2004), se muestran en las tablas posteriores, se usaron dos controles, uno positivo y otro negativo para verificar los posibles falsos positivos y comprobar la ausencia de contaminación en las reacciones.

Para la detección del virus de la mancha blanca se utilizó tanto el kit (IQ 2000TM System Kit, Farming Intelligene Technology Corporation Inc., Taiwan) como el kit regular de DiagXotics. El sistema de detección de IQ2000 consiste de un PCR anidado que está considerado como uno de los más efectivos, como herramienta de diagnóstico para estos patógenos, por su sensibilidad y especificidad, ya que es capaz de diferenciar 4 niveles de infección; muy ligera, ligera, media y severa. En las tablas 2 A y B se presentan las dos reacciones del PCR anidado.

Tabla 3.- Mezclas de reacción para PCR anidado (kit IQ2000).

Mezcla de reactivos primera reacción		
Reactivo	Volumen para una reacción (µl)	Concentración final
Primera mezcla	7.5	
Taq Polimerasa	0.5	2 U/µl
ADN	2	
Volumen total	10	

Mezcla de reactivos segunda reacción		
Reactivo	Volumen para 1 reacción (μl)	Concentración final
Segunda mezcla	14	
Taq Polimerasa	1	2 U/μl
ADN	2	
Volumen total	17	

U/μl= unidades por microlitro

Debido a que se usaron kits en los cuales están estandarizadas las cantidades de la mezcla completa que contiene los iniciadores, reactivos para PCR y la enzima polimerasa no es posible determinar la concentración de la mezcla, solamente nos proporciona la concentración de la enzima.

Tabla 4.- Programas de termociclado para cada una de las reacciones de PCR.

Programa de termociclado para la primera reacción

T°C	Tiempo (seg)	No. de ciclos
94	30	
62	30	
72	30	5
94	15	
62	15	
72	20	
72	30	
20	30	
4	constante	

Programa de termociclado para la segunda reacción

T°C	Tiempo (seg)	No. de ciclos
94	20	
62	20	
72	30	25
72	30	
20	30	1
4	Tiempo indefinido	

Las amplificaciones utilizando el kit regular de DiagXotics que consiste de una perla que contiene los reactivos, en la que solamente se debe adicionar los iniciadores, agua y el ADN templado, se realizó como se indica en la Tabla 4.

Tabla 5.- Mezcla de reacción y programa de termociclado para PCR con el kit de DiagXotics.

Mezcla de reacción		
Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Concentración
1 perla (contiene reactivos)		
ADN molde	2	
Iniciador F	1	5 µM
Iniciador R	1	5 µM
Agua	21	
Total de la reacción	25	
Programa de termociclado		
Temperatura °C	Tiempo (seg)	No. de ciclo
95	2 min	1
94	30	
60	30	
72	60	15
72	7 min	
4	Tiempo indefinido	

5.1.4 Electroforesis de los productos de PCR

Para la visualización de los productos de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X (3.504 gr de ácido bórico .216 M, 14.0264 Tris HCl 2.210 M, 2 ml de EDTA .2 M, aforar con agua para completar 1 L) a un voltaje de 100 ó en buffer SB 1X (.4 gr de hidróxido de sodio .01 M, 2.25 gr de ácido bórico 0.04 M, aforar con agua para completar 1 L) a un voltaje de 150-200 volts o en geles de poliacrilamida al 8% en buffer TBE 1X a 100 volts.

5.1.4.1 Preparación de geles de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida al 8%. Se colocaron dentro de la cámara de electroforesis conteniendo TBE 1X. En un papel encerado se colocaron 2 µl de buffer de carga (0.25% (p/v) azul de bromofenol, 0.25% (p/v) xilencianol, 30% (v/v) glicerol). Se tomaron de 7 a 10 µl y se mezcló con el buffer de carga de cada uno de los productos de PCR de la segunda reacción se depositaron en cada orificio del gel de poliacrilamida, cargando en un orificio del mismo gel el marcador de peso molecular (bioline) de 100 a 1000 pb. Se dejó correr la electroforesis aproximadamente de 80 min con un voltaje de 100 V. Después, se tiñeron los geles en bromuro de etidio (0.5 µg/ml) por 3 minutos y se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente fueron visualizados en un transiluminador Marca Spectroline Modelo TC-254R. Por último se tomó fotografías a los geles con una cámara digital (Marca Sony modelo Cyber-Shot) para documentar los resultados guardando las fotografías con la descripción correspondiente.

5.1.4.2 Preparación de geles de agarosa

Los productos de PCR fueron fraccionados en geles de agarosa al 1.5% (p/v), con Buffer SB aplicando un voltaje de 200 V. En los geles se cargó 5 µl del producto de PCR más 1 µl de buffer de carga (0.25% (p/v) azul de bromofenol, 0.25% (p/v) xilencianol, 30% (v/v) glicerol). Después se tiñeron los geles con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se enjuagaron con agua destilada, se analizaron mediante fotografía tomadas con cámara digital (Sony) y adaptada con filtro para luz ultravioleta.

5.2 Análisis estadístico

La prevalencia de WSSV en *Cherax quaricarinatus* se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\text{Prevalencia} = \left[\frac{\text{Número de estanques+}}{\text{Número de estanques-}} \right] \times 100$$

5.3 Secuenciación de un fragmento de ADN del virus aislado del genoma de WSSV

5.3.1 Purificación de ADN viral a partir de un gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit)

A partir de los fragmentos amplificados mediante PCR, se cortó la banda de ADN del gel en agarosa al 2% con una navaja de bisturí nueva. El gel fue colocado en un tubo Eppendorf, se adicionó tres volúmenes de buffer QC a un volumen de gel, Ej.: 300 µl de QC por cada 100 mg de gel, para geles de agarosa de más del 2% se tienen que agregar 6 volúmenes de buffer QC. La máxima cantidad de gel por columna es de 400 mg. Para cortes de más de 400 mg se utilizó más de una columna. Posteriormente se incubaron las muestras a 50 °C por 10 minutos (hasta que el gel estuvo disuelto), mezclando por vórtex cada 2-3 minutos durante la incubación.

Después se disolvió completamente el gel, el color de la mezcla debe ser amarillo. En los casos que la coloración resultó naranja o violeta, se adicionó 10 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.0 y se mezcló. El color se tornó amarillo. Se adicionó 1 volumen de isopropanol a la muestra y se homogeneizó. Seguido de esto se colocó una columna en un tubo de 2 ml. El máximo volumen de una columna es de 800 µl. Se aplicaron las muestras en la columna y centrifugó por 1 minuto. El sobrenadante fue descartado y ensamblado de nuevo la columna en el tubo de colección. Para lavar se adicionaron 75 µl de buffer PE a la columna y se centrifugó por 1 minuto. La columna fue incubada a temperatura ambiente 2-5 minutos después del buffer, antes de centrifugar. El fluido fue descartado y centrifugado por 1 minuto a 13 000 rpm (17900x g). Se colocó la columna en un tubo de centrifuga de 1.5 ml. Para eluir el ADN y luego adicionar 50 µl de buffer EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5) o agua al centro de la membrana y se centrifugó por 1 minuto. Para aumentar la concentración de ADN se adicionó 30 µl de buffer de elución al centro de la membrana, se dejó la columna 1 minuto para luego centrifugar 1 minuto. Obtención del ADN eluído.

5.3.2 Ligación, transformación y clonación del fragmento de ADN en el vector TOPO pCR4^R-TOPO de 3954 pb

Para la reacción de clonación, los reactivos fueron mezclados, incubando 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fue colocada la reacción en hielo o en su defecto se puede dejar toda la noche a -20 °C. Se agregó 2 µl de la reacción anterior un vial con *E. coli* químicamente competente One Shot, mezclando sin pipetear. Esta mezcla fue incubada en hielo 5 min para luego someterse a choque térmico por 30 seg., a 42 °C, la cual fue transferida a hielo agregando 250 µl de medio de cultivo SOC. Los tubos fueron colocados en el agitador a 37 °C por 1 h. Después, se transfirieron 25-200 µl a las cajas con el medio de cultivo LB, adicionado de ampicilina (50 µg/ml), incubándose 16 h a 37 °C. Al término de la incubación, se observaron las colonias transformantes.

5.3.3 Selección y análisis de clonas TOPO10 positivas

Con un palillo de madera estéril se tomó por separado una muestra de cada colonia crecida sobre agar y se sembró en cajas cuadrículadas con agar LB con 50 µg/ml de ampicilina. Cada colonia fue debidamente identificada en la cuadrícula y se incubaron a 37 °C por 24 h. El procedimiento anterior se realizó pero las resiembras fueron en tubos con 3 ml de caldo LB adicionado con 50 µg/ml de ampicilina, identificando cada tubo con la correspondiente cepa en la cuadrícula y se incubaron a 37 °C por 24 h con agitación constante de 250 rpm. De cada uno de estos cultivos líquidos se guardaron alícuotas de 1 ml a -70 °C (850 µl del cultivo +150 µl de glicerol estéril).

5.3.4 Identificación de bacterias recombinantes mediante PCR con iniciadores específicos del fragmento clonado

De cada cepa sembrada en caldo LB, se tomó 1 ml y se realizó una extracción de DNA plásmido (miniprep) (Sambrook J., 1989). Se realizó una reacción de PCR utilizando los iniciadores específicos del fragmento clonado, así como las condiciones de PCR establecidas para dicho juego de iniciadores.

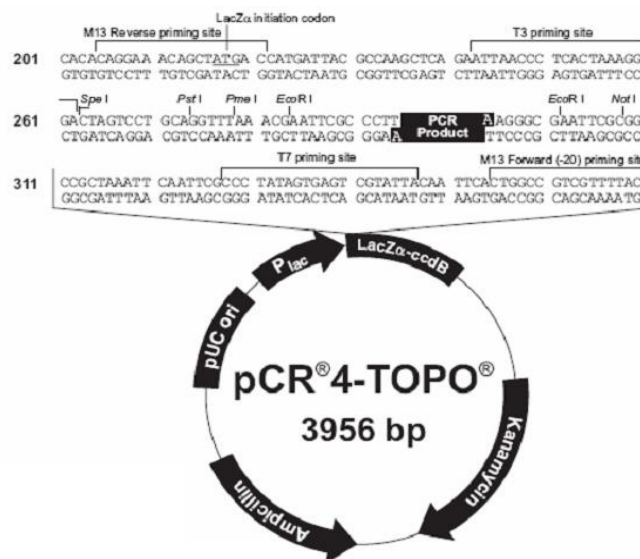


Figura 4.- Vector de clonación TOPO pCR⁴-TOPO de 3954 pb.

En la tabla 6 se presenta la mezcla de reactivos realizada para hacer la ligación del producto de PCR fresco con el vector de clonación.

Tabla 6.- Reacción de clonación TOPO.

Reactivo	Volumen (μ l)
Vector de clonación	1
Producto de PCR fresco	4
Solución salina	1
Volumen final	6

5.3.5 Purificación del plásmido (Mini Prep. QIAGEN)

Se obtuvo una pastilla a partir de dos centrifugados del cultivo, con un volumen de 1,500 ml cada uno a 300 rpm. La pastilla bacteriana fue resuspendida en 300 μ l de buffer P1. Se agregó 300 μ l de buffer P2, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente fue adicionado 300 μ l de buffer P3 e incubó en hielo por 5 minutos. La mezcla fue centrifugada a máxima velocidad (10000-13000 rpm) por 10 minutos y fue colectado el sobrenadante (se guardó 50 μ l para un gel). Se equilibró una columna QIAGEN Tip 20 para aplicar 1 ml de buffer QBT y vaciar la columna por gravedad.

Se aplicó el sobrenadante (50 µl) a la columna, se dejó que entrara a la resina por gravedad. La columna se lavó con 1 ml de buffer QC por 4 veces.

Posteriormente se diluyó el ADN con 800 µl de buffer QF (Se puede guardar 50 µl del eluido para un gel). Se precipitó el ADN con .7 volúmenes (0.56 ml por 0.8 ml de volumen de elución) de isopropanol a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10000 rpm por 30 minutos y se decantó cuidadosamente el sobrenadante. Se lavó el ADN con 1 ml de etanol al 70%, se secó al aire por 5 minutos y se suspendió en un volumen de 60 µl de buffer.

Se dejó secar al aire 15 minutos. Por último se hidrata el DNA en un volumen de 60 µl.

5.3.6 Análisis de Secuencia

Se cuantificó el ADN plasmídico wssv401-TOPO seq en un Espectrofotómetro Nano Drop Modelo: ND-1000. Se realizaron 2 lecturas y se obtuvo el promedio en nanogramos/µl el cual fue de 21.4 ng/µl

Con base al resultado de la cuantificación se procedió a preparar el coctel de reacción de PCR para secuencia usando la cantidad de ADN recomendada por el manual del fabricante, posteriormente se procedió a secuenciar el fragmento de 401 pb de WSSV en TOPO-seq.

Para el análisis de secuencia se utilizó el equipo (3100-Avant Genetic Analyzer. (AB Applied Biosystems). Primero se realizó un PCR para secuencia con los siguientes componentes y cantidades para cada reacción: se utilizó una mezcla de reactivos del kit (BigDyeR Terminador v3-1 Cycle Sequencing Kit) especial para secuencia de Aplied Biosistems en una concentración 2X. Se utilizó 128.4 ng/µl de ADN plasmídico, usando el iniciador T3 provisto en el kit TOPO TA Cloning Kit for Sequencing en una concentración de 200 ng por reacción, buffer del kit (cantidad recomendada por el fabricante) y agua para completar una reacción de 20 µl.

En la tabla 7 se registra las cantidades de los reactivos utilizados y las concentraciones finales en la mezcla, de igual forma se registraron las temperaturas incluídas en el programa de termociclado.

Tabla 7.- PCR para secuencia.

Mezcla de reacción		
Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
Big Dye v3.1	4	2X
Buffer	4	10X
Iniciador T3	1	5 µm/mM
ADN clonado	6	100 ng/µl
Agua	5	
Volumen total	20	

Programa de termociclado		
T°C	Tiempo	No. de ciclos
94	2	1
94	1	1
55	1	
72	1	25
72	7	1
4	Tiempo indefinido	

5.3.7 Protocolo de purificación en columnas Centri-Sep a partir del PCR plasmídico

Después de la PCR se purificó el producto con columnas Centri-Sep. La columna fue reconstituída con 800 µl de agua por 30 minutos a temperatura ambiente sobre la membrana. Se mezcló por vortex, removiendo las burbujas del gel de la columna por inversion. Primero fue removida la tapa de arriba, luego la de abajo. Se colocó la columna en un tubo de drenado de 2 ml, descartando el fluido del tubo (aproximadamente 200-250 µl). Posteriormente fue centrifugado a 7500 g por 2 min. Se removieron aproximadamente 300 µl de fluido. La columna fue retirada de la luz y transferidos 20 µl de la reacción de secuencia directa cuidando de no hacer contacto con el gel ni las paredes de la columna. La columna fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugada por 2 min a 7500 g. El purificado resulta de unos 20 µl. El purificado fue liofilizado a 65°C. Se recuperó en formamida (20 µl).

Posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos y fue colocado en hielo por 10 minutos. Las muestras se metieron a secuenciar en un secuenciador como el que se muestra en la figura 6.

5.3.8 Programación en el equipo de secuenciación

La programación se hizo según las especificaciones de los manuales de secuencia del proveedor y está representada en la tabla 8.

Tabla 8.- Programa del equipo de secuenciación

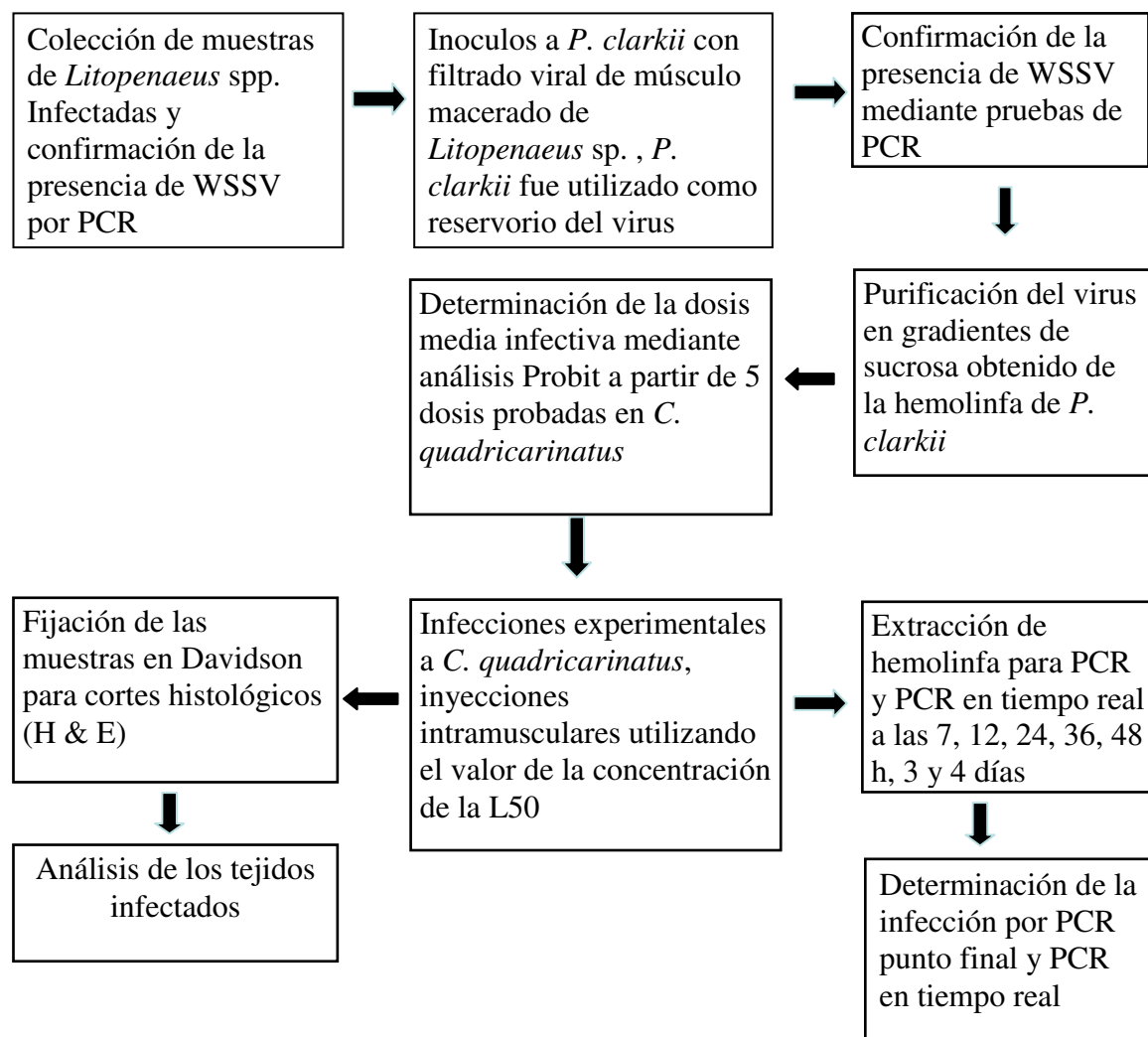
Nombre	Dye set	Mobility file	Comment	Proyect	Run	Analysis
WSSV-1	Z	DT 3100		3100	Ultra Seq	BC-3100 A
		POP4(BD		avant.	36-POP4	POP 4 R-
		V3) V1.Bob		Proyect	Default	SEQ off
				1	Module	Ftoff.Saz



Figura 5.- Equipo de secuenciación.

5.4 Análisis y bioensayos para determinar la susceptibilidad de *C. quadricarinatus* al virus WSSV

Tabla 9.- Diagrama metodológico. Desglose de la metodología utilizada para los análisis y bioensayos de laboratorio.



5.4.1 Colección del material biológico

Para la segunda fase de este estudio, que consistió en realizar pruebas de laboratorio, previamente se recolectaron camarones del género *Litopenaeus* sp. infectados con WSSV provenientes de epizootias de granjas camaronícolas del estado de Sonora. Muestras de tejido muscular de estos camarones fueron macerados y centrifugados para infectar a través de inyecciones con el filtrado del virus al acocil rojo *P. clarkii* que fue utilizado como reservorio, y fue almacenado con glicerol al 40% en ultracongelador de -70 °C.

Posteriormente estos decápodos fueron recolectados de ambientes naturales de Santiago, Nuevo León (Congregación La Boca) y se verifico que estuvieran libres del WSSV mediante pruebas de PCR. Después se inocularon mediante la ingestión vía oral de material macerado y filtrado, y estuvieron en observación los acociles visualmente cada 24 horas, del 3er al 7º fueron colectadas muestras de hemolinfa y se observó la inducción de infección, posteriormente se realizaron pruebas de PCR para confirmar la infección del virus, fue extraída hemolinfa de los acociles para iniciar el proceso de purificación del virus en gradientes de sucrosa, que fueron utilizados para determinar la dosis letal L50 y para las pruebas de PCR en tiempo real. Todos los organismos infectados fueron conservados en ultra congelación a -70 °C.

5.4.2 Confirmación de la presencia de WSSV

Se confirmó la presencia del virus ejemplares de *P. clarkii* utilizados como reservorio por medio de pruebas moleculares (PCR) siguiendo los procedimientos anotados en apartado 5.1.

5.4.3 Purificación de WSSV en gradientes de sucrosa

A los 3 a 7 días fue extraída la hemolinfa a los ejemplares infectados y centrifugada a 1500 g por 10 minutos. El sobrenadante fue colocado en solución de sucrosa al 35 % (peso/volumen en TN) y centrifugado a 89 000 g por una hora a 4°C en una centrifuga marca Corning Modelo. L-835.

La pastilla fue resuspendida en TN (Tris HCL 0.02 M, NaCl 0.2 M), y posteriormente fue utilizado para realizar gradientes lineales de sucrosa desde 20% a 65%. Las bandas virales fueron colectadas y mezclaron de nuevo con TN, se centrifugaron de nuevo a 89, 000 g por 1 hora a 4°C. La pastilla resultante se resuspendió en TN, (Rodríguez *et al* 1995, Jyn-Ming Tsai *et al.* 2004) y después fue utilizada en desafíos.

5.4.4 Determinación de la dosis letal media L50 mediante ensayos experimentales

Un lote de 60 individuos de *C. quadricarinatus* fue recolectado de estanques de cultivo de granjas del Estado de Tamaulipas. Estos ejemplares fueron trasladados vivos en hieleras con agua al Laboratorio Central Regional de Monterrey (LCRM) del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León, para utilizarlos en los bioensayos de infección con WSSV. Para el proceso de aclimatación se mantuvieron los acociles australianos en peceras de vidrio de 10 galones con oxigenación por bombas de aire. Todos los organismos se alimentaron con alimento balanceado para camarón y la temperatura promedio del agua se mantuvo a 22°C. La infección experimental en *C. quadricarinatus* se logró a través del purificado del virus obtenido de la infección hecha en el acocil rojo.

Se probaron 5 dosis (Tabla 10) conteniendo 10 organismos de la especie *C. quadricarinatus* de cada dosis para encontrar la dosis letal media L50, también se utilizó a 10 organismos inyectados con TN al 1%, pH 7 como controles negativos, de éstos experimentos se hizo un análisis de los datos obtenidos por el método estadístico Probit.

Tabla 10.- Registro de las 5 dosis probadas en 10 organismos cada una.

No. de dosis	Concentración (ng/μl)
1	42.22
2	31.67
3	21.11
4	10.56
5	5.25
6	0

5.4.5 Aplicación de la dosis L50 a *C. quadricarinatus* para medir la susceptibilidad mediante análisis por PCR y PCR en tiempo real

Se hicieron desafíos para medir susceptibilidad por medio de PCR en tiempo real, se utilizaron 10 peceras, se colocó un acocil en cada una de las peceras, En 9 de estas peceras se infectó a los acociles con el virus de la mancha blanca vía inyección en el segundo segmento abdominal con jeringa de 3 ml, y uno se usó como control inyectado solamente con TN al 1%, pH 7. Para realizar estos desafíos previamente se probaron 5 dosis de purificado viral y se seleccionó una mediante análisis PROBIT.

Se sacrificaron los acociles uno por uno a partir de las 6 horas, 12, 24, 36, 48, 72, 4 días, 6 días y 8 días, a los cuales se extrajo la hemolinfa para pruebas de PCR y PCR en tiempo real.



Figura 6.- Bioensayos con *C. quadricarinatus*. Dosis infectivas.

5.4.6 PCR en tiempo real

El equipo que se utilizó fue el 7300 Real Time PCR System de Applied Biostems. Se utilizó el kit llamado Ta^{TM} SYBR^R Green with ROX de BIO-RAD. Dicho kit, está concentrado a 2X, listo para usarse en la mezcla de reacción, contiene todos los componentes excepto los iniciadores y el ADN templado.

5.4.7 Selección de iniciadores para PCR Tiempo Real

Los iniciadores Blf/Blr que amplifican 69 pb fueron sintetizados en base a la secuencia reportada por Van Hulten, 2001 en el banco de genes, estos iniciadores fueron utilizados en las pruebas de PCR en tiempo real.

Tabla 11.- Registro de las características de los iniciadores de 69 pb, Blf/Blr.

Iniciador Blf
5' TGG TCC CGT CCT CAT CTC AG 3'
ID del oligo: 2908758
Concentración: 100 pm/ml
Peso Molecular: 6020 g/mol
Tm: 61.4°C
Contenido GC: 60%
Iniciador Blr
5'GCT GCC TTG CCG GAA ATT AGT 3'
ID del oligo 2908759
Concentración: 100 pm/ml
Peso Molecular: 6437
Tm: 59.8°C
Contenido GC: 52.4%

Los iniciadores se probaron en análisis por PCR punto final para verificar su funcionalidad. Se utilizaron los reactivos y cantidades registrados en la tabla 12.

Tabla 12.- Mezcla de reacción con reactivos y programa de termociclado estándar para PCR

Mezcla de reacción PCR		
Reactivo	Vol. Para 1 reacción (µl)	Concentración final
Buffer	2.5	10X
MgCl	1	50 mM
dNTP'S	1	.2 mM
Taq. pol.	.75	5U/µl
ADN molde	2	
Inic. Blf	1	250 mM
Inic. Blr	1	250 Mm
Agua	15.75	
Vol. total	25	
Programa de termociclado		
T°C	Tiempo	No. de ciclos
95	2 min	1
95	2 min	1
94	30 seg	
60	30 seg	
72	60 seg	35
72	7 min	
4	Tiempo indefinido	

Tabla 13.- Mezcla de reacción y programa de termociclado utilizados para PCR en tiempo real.

Mezcla de reacción para PCR tiempo real		
Componente	Volumen (µl)	Conc. Final
iTaq TM SYBR ^R Green	25	2X
Supermix with ROX		
Iniciador Blf	1.2	250 mM
Iniciador Blr	1.2	250 mM
ADN molde	2.5	182 ng/µl
Agua libre de RNAsas	20	
Volumen Final	50	

Programa de termociclado		
T°C	Tiempo	No. de ciclos
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 seg	
60	1 min	40

El volumen final de reacción y las concentraciones de los reactivos son los recomendados por el proveedor, en la práctica se trabajó con un volumen de 20 µl de reacción.

Se hicieron diferentes diluciones del concentrado viral del virus de la mancha blanca (WSSV). A partir de la concentración original de 360 ng/µl, fueron realizadas 5 diluciones seriadas a partir de una concentración de 100 ng/µl. Con éstas diluciones se realizaron las pruebas de PCR en tiempo real. Los resultados de PCR tiempo real se graficaron contra el CT para construir la curva estándar.

5.5 Análisis histopatológico

Para el diagnóstico histopatológico los acociles se fijaron en solución Davidson AFA (335 ml de agua destilada, 330 ml de alcohol etílico, 220 ml de formalina, 115 ml de ácido acético glacial) por 48 horas, después de lavar las piezas se cortaron transversal y longitudinalmente, se pasaron a moldes, los cuales se sumergieron en alcohol al 70 % y se pasaron al procesador automático de muestras (histoquinete). Posteriormente se embebieron en bloques de parafina, que se emplearon para realizar cortes histológicos de 6 a 8 µm de espesor en un microtomo Porter blum, los cortes se colocaron en portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) Lightner (1985).

5.5.1 Técnica para la coloración de cortes infiltrados en parafina

Las laminillas se colocan en una solución de Xilol I por 5 min, seguida de xilol II 5 min, alcohol absoluto 3 min, alcohol 96% 3 min, alcohol 80% 3 min, agua destilada 1 lavado, hematoxilina de Harris observando la tinción tiempo, agua

destilada 1 lavado, se sumerge en agua acidulada de 5-10 seg, agua destilada 1 lavado, lavar en agua amoniacal de 5-10 seg, 1 lavado en agua destilada, eosina determinar el tiempo, alcohol 80% de 2-5 seg, alcohol 96% de 2-5 seg, alcohol absoluto de 2-5 seg, xilol I 5 min, xilol II 5 min. Las laminillas se dejan secar para posteriormente hacer montajes permanentes con resina sintética, adicionando un cubreobjetos, Lightner (1985).

6. RESULTADOS

6.1 Resultados de los muestreos de las 2 granjas monitoreadas para determinar la presencia de WSSV por medio de análisis por PCR

De los estanques de acociles seleccionados, utilizando hemolinfa de estos se hicieron extracciones de ADN. En la figura 9, se presentan los resultados de la electroferesis de ADN obtenido con el método High Pure PCR Template, donde se puede apreciar la calidad del ADN utilizado para las reacciones de PCR. Cabe mencionar que en todas las pruebas por PCR primeramente se verificó la presencia de ADN en geles de agarosa preparados a una concentración de .8 %.

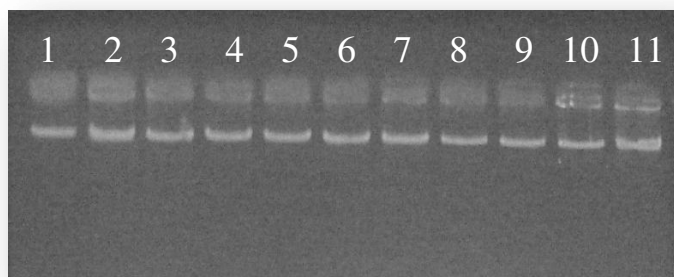


Figura 7.- Gel de agarosa con los extractos de ADN. Carriles 1-11 ADN extraído de acociles antes de realizar las pruebas de PCR para WSSV de la granja A.

6.1.1 Resultados de las pruebas por PCR para la detección de WSSV en la granja A

Para el diagnóstico de WSSV mediante PCR anidado con el kit de 1Q2000 se separó un fragmento de 848 pb, lo cual según el instructivo del kit significa que la muestra es negativa, el fragmento de 848 pb observado es un control interno constituido del ADN de los decápodos. No se observan fragmentos de ADN que correspondan al genoma viral de WSSV (Fig. 8).

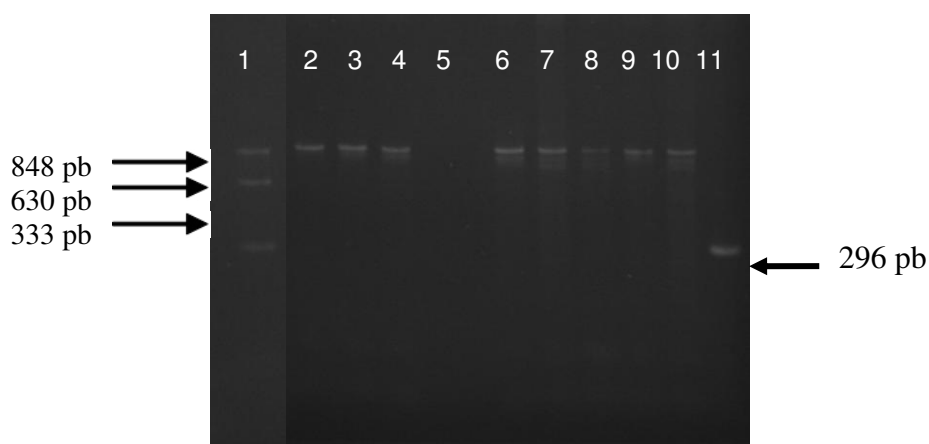


Figura 8.- Electroforesis de productos de PCR del primer muestreo de la granja A. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2-4: muestras negativas, carril 5: control negativo (agua), carriles 6-10: muestras negativas, carril 11: control positivo de 296 pb.

6.1.2 Resultados del segundo muestreo de la granja A

Se muestrearon 7 estanques de 17 disponibles. Las muestras compuestas, es decir tubos ependorff de 1- 2 mililitros conteniendo hemolinfa de 8-10 organismos cada uno, muestras de dos estanques resultaron positivas para el virus de la mancha blanca.

Utilizando electroforesis en gel de agarosa se confirmaron muestras positivas al virus WSSV, donde se obtuvieron fragmentos de 401 pb y también fragmentos de 603 pb (Kit High Pure Template de Invitrogene) que corresponden al ADN de *C. quadricarinatus*, las muestras negativas solamente presentan éste último fragmento.

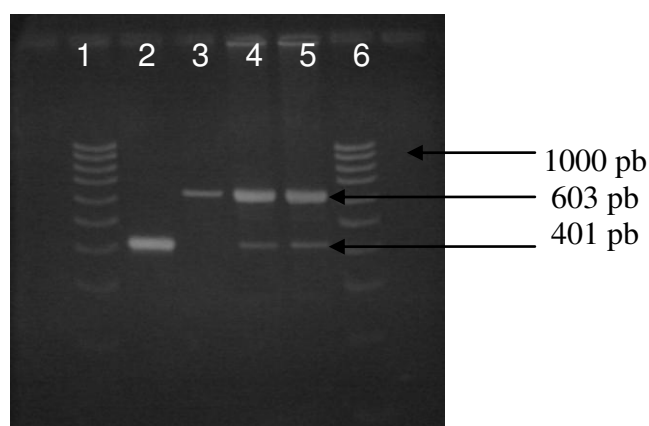


Figura 9.- Electroforesis de productos de PCR del segundo muestreo de la granja A
Carril 1: Marcador de peso molecular 1000 pb, carril 2: Control positivo (401 pb), carril 3: control negativo, carriles 4-5: muestras positivas para WSSV (401 y 603 pb), carril 6: marcador de peso molecular.

6.1.3 Resultados del primer muestreo de la granja B

De los siete estanques monitoreados ningún espécimen de *C. quadricarinatus* fue positivo a WSSV mediante las técnicas referidas anteriormente. La figura 10 presenta los productos de PCR donde las muestras son negativas por la presencia de 848 pb.

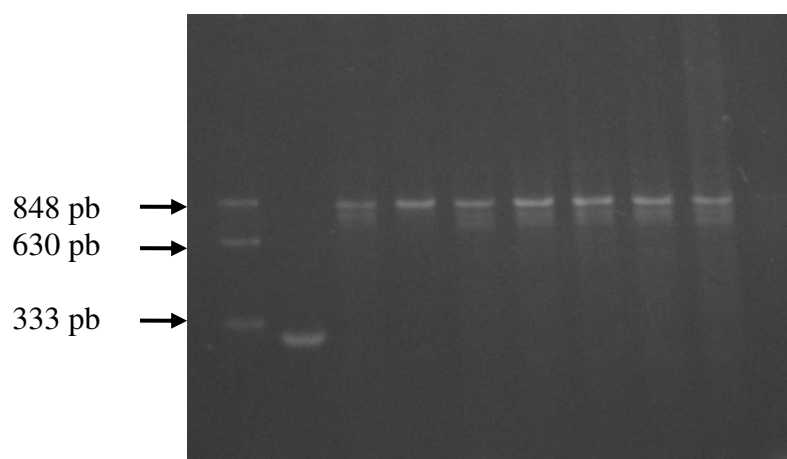


Figura 10.- Electroforesis de los productos de PCR del primer muestreo de la granja B. Carril 1: marcador de pares de bases, carril 2: control positivo, carriles 3-9 muestras negativas a WSSV, carril 10: control negativo (agua).

6.2 Prevalencia de WSSV en *C. quadricarinatus* en las dos granjas muestreadas

La prevalencia de WSSV en *C. quadricarinatus* para las dos granjas muestreadas fue de 15%. En el siguiente cuadro se muestran los registros de la prevalencia de las dos granjas de acuerdo a la fórmula señalada.

$$\text{Prevalencia} = \left[\frac{\text{Número de estanques+}}{\text{Número de estanques-}} \right] \times 100$$

Prevalencia para A: $2/7 = .29$

Prevalencia para B: $0/7 = 0$

Prevalencia para A y B: $2/14 = .15$

6.3 Purificación y clonación del fragmento de 401 pb (pertenece al gen VN1 de WSSV)

El fragmento de 401 pb perteneciente a WSSV, producto de PCR proveniente de las muestras (acociles) que se encontraron positivas fue purificado a partir del gel de agarosa utilizado en la electroforesis y clonado en el vector descrito en material y métodos. En la fig. 14 se muestra el resultado de la separación del fragmento de ADN del virus y el fragmento del hospedero de 401 y 603 pb respectivamente.

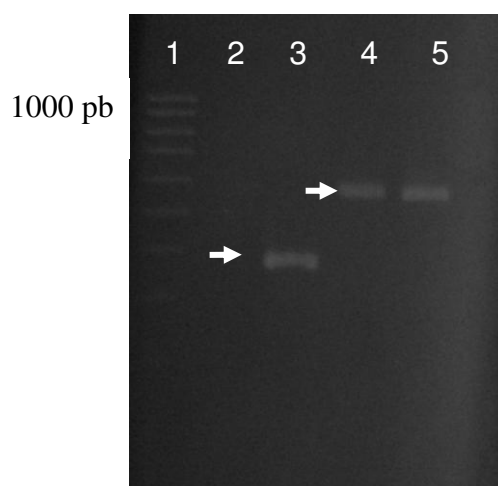


Figura 11.- Electroforesis de las purificaciones de los productos de PCR del virus y del hospedero. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pares de bases, carril 2: in muestra, carril 3: fragmento de 401 pb del WSSV, carril 4-5: fragmento de 603 pb de ADN del hospedero.

6.3.1 Ligación, transformación y clonación de los productos purificados de 401 pb y 69 pb pertenecientes a WSSV de *C. quadricarinatus*

Utilizando el vector de clonación TOPO pCR4^R-TOPO de 3954 pb se ligó, transformó y clonó los productos siguiendo la metodología redactada (apartado 7.3.2).

6.3.2 Minipreps de WSSV69-TOPO Seq y WSSV401-TOPO Seq

En la figura 14 se muestra el ADN plasmídico resultado de la purificación. Se observa ADN plasmídico relajado (rel), en la banda de abajo, ADN enrollado (enr) en la banda del medio y ADN superenrollado (senr) banda de arriba.

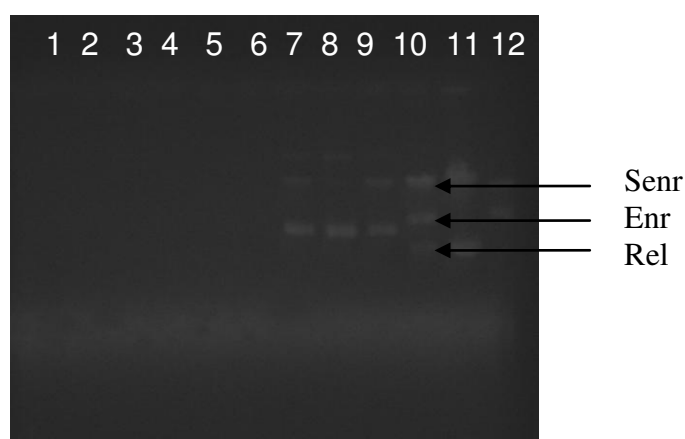


Figura 12.- Purificaciones de ADN plasmídico. Carriles 1-6: muestras obtenidas de los lavados con buffer, son negativas, carriles 7- 9: plásmido con el inserto de 69 pb., carriles 10-12: plásmido con el inserto de 401pb.

6.3.3 Digestión enzimática de ADN plasmídico con la enzima de restricción *Eco* R1

Se realizó corte con la enzima de restricción *Eco* R1 para verificar la presencia del inserto en el plásmido. En la figura 15 se muestran los fragmentos liberados del plásmido.

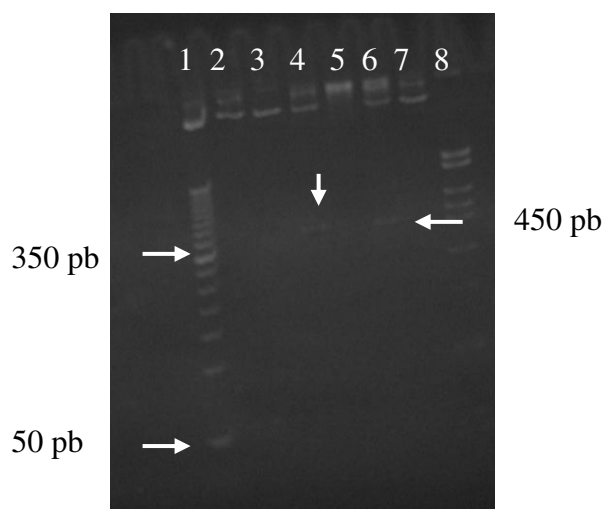


Figura 13.- Digestión enzimática del ADN plasmídico. Gel de poliacrilamida al 8%. Carril 1: marcador de pb 50-1500 pb, carriles 2-3: sin muestra, carriles 4 y 6: Fragmento e 401 pb liberado del plásmido, carriles 5-7: sin muestra, carril 8: marcador de pares 100-1000 pb.

Este análisis también se realizó por medio de PCR punto final, de igual manera se separó los fragmentos pertenecientes al genoma viral.

6.3.4 Resultados del análisis de la secuencia de ADN viral obtenida de las muestras de *C. quadricarinatus*

Seguido de la digestión enzimática se realizó PCR para secuencia (ver metodología en el apartado 7.3.6) y se procedió a realizar el análisis de secuenciación.

En la tabla 14 se muestra la lectura de la secuencia del fragmento de ADN de 401 pb correspondiente al genoma del virus de la mancha blanca encontrada en esta investigación.

La secuencia se comparó con las reportadas en el banco de genes utilizando el programa Clustal IV. NCBI (Siglas en inglés de Centro Nacional para Información de Biotecnología). Presentó homología con el gen VN1 y VN2 del síndrome del virus de la mancha blanca reportadas en el banco de genes. Los porcentajes de homología y divergencia se muestran en la tabla 14.

Tabla 14.- Secuencia perteneciente al genoma de WSSV.

GGNTGNNCNTNNACCGNGGCTGNNTCTTGTGCCNNNTNGGGNATTTTTCCACACNGAGG
AAAANGANNGATAGACTANGCTCTGACNTTNTCTTCAAATCTAATAATAATGGAGGAGT
AGAATCGATGGATTATGAAGATAGCGAAACCACATCCAACAATGGTCCCGTCCTCATCTC
AGACGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACACTAATTTCCGGCAAGGCAGCTCGCCCCGG
AAAATGTACCATTTCGCCTCATGCGCCAGCGGCCCTCTCGCCTTTGAGTTCCTTCTGTCAAA
GGGAGATACATTTCGAAGAAAAGAACGCCGAACAAGGTGCAGCAGCTGCCGTATCCTCTA
CCTATTCTTCCTCTTCTAACACTACTCTTCGTAAGCATTTGGCTCGAGTTTCGGAAAGGGC
GAAATTCTCGGCCGCTAAAATCAGTTCGCCCTATAGTGAGTCCGGAATTACAAANTCACT
GGGGCGGGCGGGTTTTACAACGGCCGGTGACTGGGGAAAACCCTTGGGGCGTTTACCCC
AACCTTTAATGCGGCATTGGCGGCGACCATCCC

En la tabla 15 se registra el porcentaje de homología y divergencia entre las secuencias reportadas en el banco de genes y la secuencia encontrada.

Se llamó 401 recortado a la secuencia del fragmento encontrado que fue de 270 pb. En la fila 1: 487 VN1, fila 2: 401 recortado, fila 3: secuencia de Shin, fila 4: secuencia de Taiwán, fila 5: VN2.

En el apéndice A, se presenta la comparación de las 5 secuencias reportadas en el banco de genes incluyendo la secuencia encontrada, realizada con el programa Clustal IV. Se muestra el total de bases secuenciadas para cada reporte. 487 VN1: 486 bases, Shin completo: 1371 bases, Taiwan completo: 896 bases, VN2 completo 471 bases, 401 recortado: 270 bases.

Tabla 15.- Porcentajes de homología y divergencia de la secuencia determinada comparada con secuencias reportadas en el banco de genes.

Porcentaje de homología							Porcentaje de divergencia
*	1	2	3	4	5	*	
1	*	98.5	90.9	44.9	98.3	1	
2	1.5	*	98.5	79.3	91.5	2	
3	0.0	1.5	*	98.2	89.4	3	
4	0.9	1.9	0.2	*	43.1	4	
5	0.4	1.6	0.5	1.5	*	5	
*	1	2	3	4	5	*	
							487 VN1
							401 Recortado
							SHIN Completo
							Taiwan Completo
							VN2 Completo

En la fila 1: 487 VN1, fila 2: 401 recortado, fila 3: secuencia de Shin, fila 4: secuencia de Taiwán, fila 5: VN2.

6.4 Susceptibilidad de *C. quadricarinatus* al virus de la mancha blanca WSSV

6.4.1 Cuantificación y pruebas por PCR

Para esta prueba de susceptibilidad fueron utilizados camarones del género *Litopenaeus vannamei* de granjas del estado de Sonora que fueron confirmados como infectados de WSSV mediante análisis por PCR. Se utilizó a *Procambarus clarkii* como reservorio del virus, de donde fue purificado en gradientes de sucrosa y una vez cuantificado fue inoculado a *C. quadricarinatus*.



Figura 14.- ejemplar de la especie *Procambarus clarkii* utilizado como reservorio de WSSV.

En la cuantificación se obtuvo un purificado de 322 ng/μl. A partir de esta cuantificación se realizó una curva estándar con las diluciones seriadas ya mencionadas en metodología.

Los iniciadores utilizados para PCR en tiempo real fueron verificados en ensayos de PCR punto final. En la figura 17 se muestran los resultados de la amplificación de los productos esperados. El fragmento de 69 pb clonado fue utilizado en los ensayos para PCR en tiempo real como control positivo.

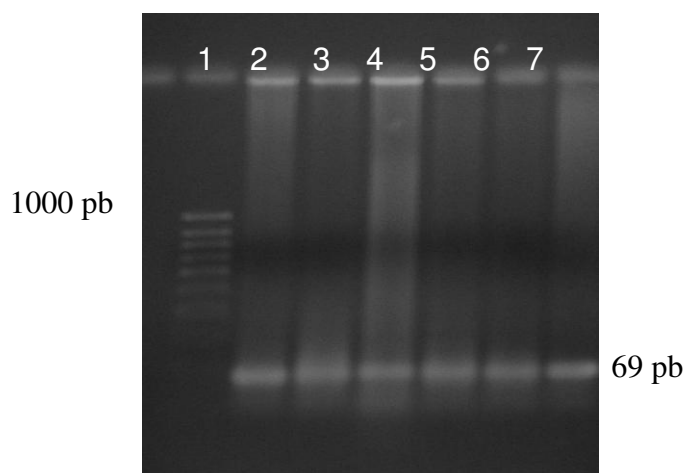
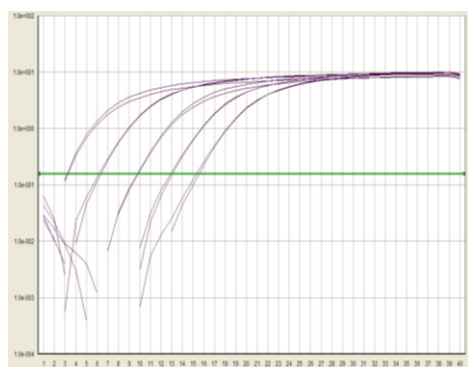


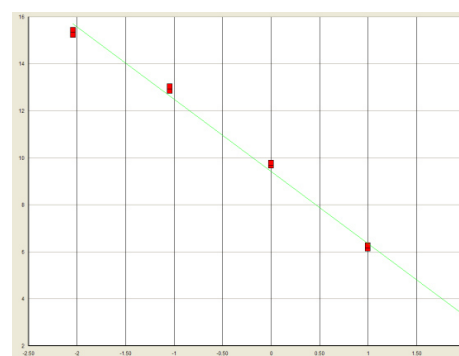
Figura 15. Muestras positivas para WSSV por PCR punto final. Carril 1: Marcador de ladder 100-1000 pb, carriles 2-7: Muestras positivas para WSSV.

6.4.2 Curva estándar para PCR tiempo real

Para la optimización del ensayo de PCR tiempo real se obtuvo un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9959 en la curva estándar con las muestras de ADN, intercepto = 9.4135, slop = 3.0702 (Figura 18). Se prepararon diluciones seriadas (Gráfica B) del purificado viral.



A. No. de ciclo



B. Log [ADN]

Figura 16 A.- Curvas de amplificación. Diluciones seriadas analizadas por duplicado.

Figura 16 B.- Curva estándar de PCR en tiempo real, generada mediante 5 diluciones seriadas a partir de 100 ng/μl de muestras cada una por duplicado.

Tabla 16.- Valores obtenidos de la curva estándar utilizando concentraciones diferentes de ADN.

No. de muestra	Cantidad de ADN (ng/ μ l)	Ct
1	2.20 E ²	4.37
2	2.20 E ³	6.81
3	2.20 E ⁴	9.80
4	2.20 E ⁵	12.14
5	2.20 E ⁶	14.75

Los valores de Ct representan un valor promedio obtenido de cada una de las muestras probadas por duplicado, estas muestras fueron diluidas a partir de 100 μ l en series de 10.

6.5 Resultados de las infecciones experimentales realizadas para obtener la dosis letal media (L50)

Tabla 17.- Registro de las dosis probadas y los resultados a los 30 días postinfección.

No. animal	Dosis ng/ μ l	Número de especímenes	Respuesta observada	Respuesta esperada	Residual	Probabilidad
1	42.22	10	8	8,811	-0,811	0,881
2	31.67	10	9	6,933	2,067	0,693
3	21.11	10	2	4,322	-2,322	0,432
4	10.56	10	4	1,988	2,012	0,199
5	5.25	10	.1	1,178	-0,178	0,118
6	0	10	.0	0,64	-0,64	0,064

Los datos de mortalidad promedio de acociles infectados con las diferentes concentraciones del virus fueron analizados con el método PROBIT, de acuerdo a éste método la L50 fue de 23.776 ng/ μ . NOTA: Ver tabla del apéndice B.

La siguiente gráfica representa los valores de probabilidad y dosis por análisis Probit para determinar la L50.

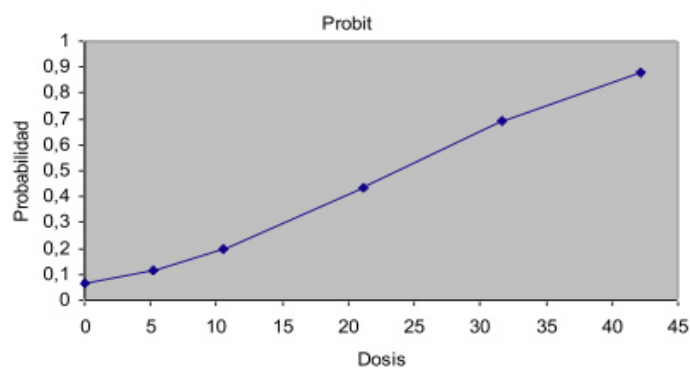


Figura 17. Análisis Probit de las dosis de virus empleadas en las infecciones de *Cherax quadricarinatus*.

6.5.1 Utilización de la L50 en pruebas infectivas de *C. quadricarinatus*

La dosis del purificado viral de 23.77 ng/ml obtenida del análisis PROBIT fue utilizada para infectar especímenes a diferentes tiempos con la intención de medir el curso de la infección. Posteriormente se realizaron análisis por PCR para comprobar la infectividad del virus. En la siguiente figura (20) se muestra una corrida de PCR con muestras positivas resultado de estas pruebas.

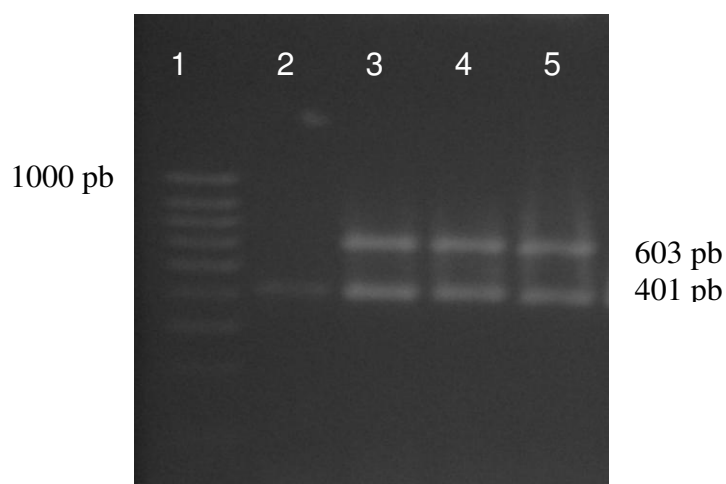


Figura 18. Muestras positivas de WSSV obtenidas de infección experimental. Carril 1: marcador de peso molecular de 1000 pb, carril 2: control positivo, carriles 3-5: muestras positivas (3 repeticiones de la misma muestra). 601 pb: Fragmento ADN del camarón. 403 pb: Fragmento ADN de WSSV.

Posteriormente se realizaron infecciones experimentales a diferentes intervalos de tiempo; 4 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 4 y 6 días. Estas mismas muestras se analizaron por PCR en tiempo real presentando los mismos resultados en cuanto a muestras positivas y negativas.

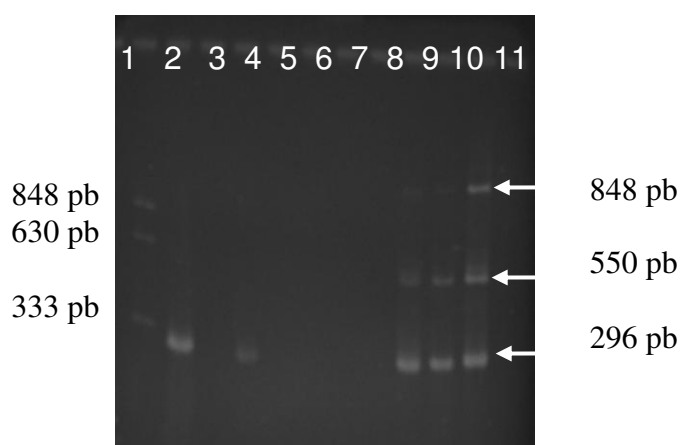


Figura 19. Muestras provenientes de Infecciones experimentales con WSSV en *C. quadricarinatus*. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control positivo, carril 3: control negativo, carril 4: 7 horas postinfección (muestra positiva leve),

carril 5: 12 horas (negativa), carril 6: 24 horas (negativa), carril 7: 36 horas (negativa), carril 8: 48 horas (negativa), carril 9: 72 horas (positiva), carril 10: 4 días (positiva severa), carril 11: 6 días (positiva severa).

Tabla 18.- Resultados de las amplificaciones de las muestras provenientes de infecciones experimentales por PCR tiempo real.

No. de organismo	Tiempo de infección (horas)	Resultado
1	7	Positiva
2	12	Positiva
3	24	Positiva
4	36	Negativa
5	48	Negativa
6	72	Positiva
7	4 d	Positiva

Los resultados de las infecciones a las 7, 12 y 24 h después de la infección fueron positivos, sin embargo a las 36 y 48 horas no se detectó infección viral, en las pruebas por PCR se muestran negativos, a las 72 h y 4 días resultaron positivos.

Las curvas que corresponden a los resultados anteriores se presentan en la siguiente figura. Donde se muestran las 5 muestras positivas arriba de de línea del umbral, mientras que las negativas se quedan debajo de dicha línea.

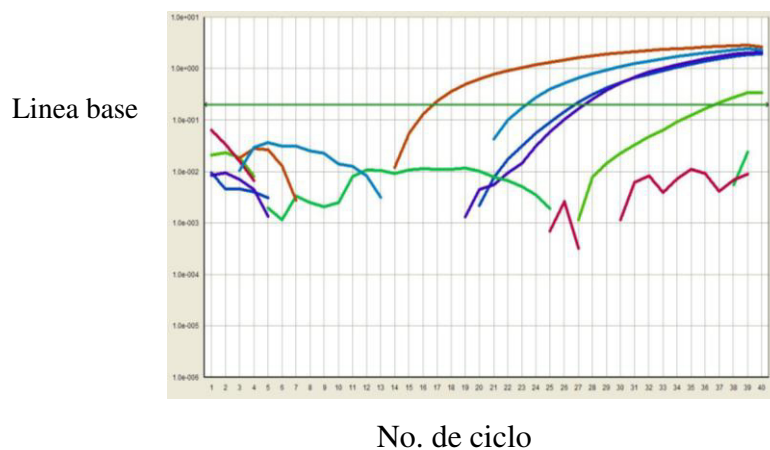


Figura 20.- Curvas de amplificación de las muestras procedentes de infecciones experimentales.

Tabla 19.- Reporte de resultados de los Cts y de las cuantificaciones de las muestras probadas por PCR en tiempo real a tiempos determinados.

Tiempo de infección	Ct	Cantidad calculada(ng/μl)
7 h	26.72	6.06 E ¹¹
12 h	27.38	3.11 E ¹¹
24 h	36.64	2.64 E ¹⁵
36 h	-	-
48 h	-	-
76 h	16.68	1.58 E ⁶
4 d	23.28	1.97 E ⁹

Ct: Umbral

6.6 Histopatología del virus de la mancha blanca (WSSV)

Los ejemplares de *C. quadricarinatus* infectados con el virus del síndrome de la mancha blanca no presentaron síntomas de apariencia anormal externa (manchas blancas en el cefalotórax), en algunas ocasiones se presentó coloración naranja en el cefalotórax, flacidez en los apéndices corporales cuando la enfermedad estuvo en

etapa aguda. La sintomatología más marcada que se observó fue la falta de apetito y aletargamiento en la etapa de infección.

En los cortes histológicos 8.6.1 A teñidos con Hematoxilina & Eosina y 8.6.1 B se encontraron células con las características de infección que se presentan por WSSV, cuerpos de inclusión tipo Coudry A eosinofílicos o basofílicos intracelulares, en etapas tempranas se observa hipertrofia nuclear en las células dañadas que a menudo se observan eosinofílicas y en etapas tardías basofílicas respectivamente, la cromatina se presenta marginada muy notable, atrofia nuclear. En las siguientes imágenes se muestran células infectadas, con núcleo agrandado eosinofílicas (flechas).



Figura 21. A.- Corte histológico de branquias de *C. quadricarinatus* teñido con H&E.



Figura 21. B.- Corte histológico de tejido muscular de *C. quadricarinatus*. Teñido con H & E.

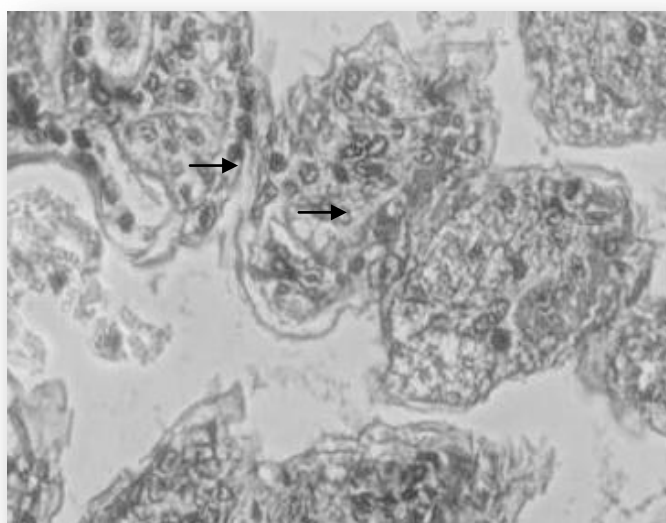


Figura 22. Corte histológico de branquias presentando células infectadas con WSSV. H & E. 25 X. Fotografía en escala de grises.

7. DISCUSIONES

La diversidad de acociles está constituida por 29 géneros y 623 especies (incluyen 18 subespecies); 439 son americanas y 49 especies son endémicas de México (Hobbs Jr., 1989; Crandall, 1999; Fetzner, 2008). Estas especies se incluyen en 3 familias: Astacidae, Parastacidae y Cambaridae (Taylor *et al.*, 1996; Taylor, 2002). La familia Parastacidae congrega 14 géneros y casi 139 especies (Crandall *et al.*, 1999). Los parastácidos habitan en el hemisferio sur y en Sudamérica, Nueva Zelanda, Madagascar, Australia, Papua, Nueva Guinea y la Isla Aru (Hobbs, 1988; Huner, 1994; Holdich, 2002).

De acuerdo a la literatura, hay más de 100 especies de acociles en Australia, casi la mitad (43) corresponde al género *Cherax*, tres de ellas como *C. tenuimanus* (marrons), *C. destructor* (yabbies) y *C. quadricarinatus* (redclaw) son cultivadas comercialmente e intensivamente en Australia y fuera de este continente, al ser introducidas alrededor del mundo con este propósito (Holdich, 2002; Masser y Rouse, 1997; Mendoza *et al.*, 2011). Este género tiene una amplia distribución en Australia, ocurre en todos los estados y climas, con tallas de 60 a 400 mm de longitud total, que lo hace uno de los parastácidos más adecuado para acuicultura (Huner, 1994).

El acocil de pinza roja *C. quadricarinatus* es de gran talla, el cual habita en la mitad y este del norte de Australia. Dentro de Australia se ha expandido su distribución hacia el sur, por introducciones con fines de acuicultura y por ser una de las especies más promisorias, también fue translocada con este mismo fin en diferentes países, principalmente a los EUA desde 1989 (Huner, 1994; Masser y Rouse, 1997; Vázquez y López, 2007). El acocil de pinza roja soporta altas temperaturas y bajas concentraciones de oxígeno, toleran condiciones de cultivo en hacinamiento. Pueden crecer de 56.7 a 113.4 g, en los 5 o 7 meses más templados del sureste australiano (Masser y Rouse, 1997). Es similar a los acociles nativos americanos en su anatomía general, reproducción y hábitos alimenticios. Sin embargo, hay importantes diferencias entre los australianos y americanos, esto incluye: tallas más grandes, mayor porcentaje de carne, desoves múltiples anuales y

alta fecundidad, además, sin hábitos agresivos y los rangos de temperatura para su crecimiento oscilan de 21 a 32 °C (Masser y Rouse, 1997).

El acocil australiano *C. quadricarinatus* ha sido exportado a otros países con climas tropicales y subtropicales, como el sur de Asia, Norte y Sudamérica y África, donde su producción comercial se ha intentado (Lawrence y Jones 2002, Edgerton, 2005; Vázquez y López, 2007; Lawrence y Jones, 2002), aunque no siempre de manera legal (Lynas *et al.*, 2007). En los 90's, la producción comercial y venta de reproductores y juveniles de *C. quadricarinatus* ocurrió en los Estados Unidos de América, y un sustancial desarrollo de la acuicultura de esta especie se presentó en Ecuador, con limitado éxito (Romero, 1998).

Lawrence y Jones, (2002) mencionan que otros países de América Latina, que producen *Cherax*, incluye a Argentina, Costa Rica, Chile, Paraguay y Uruguay que cosecharon 22 toneladas en 2003 (FAO, 2006b, Mendoza *et al.*, 2011). En Ecuador la mayoría de granjas cerraron en 1998, principalmente por enfermedades y escasez de mercado (Mendoza *et al.*, 2011). De acuerdo con Arredondo (2004), la primera introducción exitosa de *C. quadricarinatus* en México fue en 1995 desde Texas para un proyecto de la entonces Secretaría de Pesca, a partir de este año varias instituciones académicas fueron receptores de especímenes (Bortolini *et al.*, 2007; Mendoza *et al.*, 2011). Posteriormente se crearon varias instalaciones acuícolas con fines comerciales en los estados de Colima, Morelos, Jalisco, Tamaulipas, Yucatán y Distrito Federal (Ponce-Palafox *et al.*, 1999; Mendoza *et al.*, 2011). Posteriormente, *C. quadricarinatus* fue introducido a otros estados, con el mismo fin económico (Mendoza *et al.*, 2011). En Tamaulipas, las granjas de cultivo del acocil de pinza roja iniciaron en el 2000, sin embargo, gran parte de las granjas cerraron en el 2005, esto se atribuye a los resultados económicos negativos y con un impacto ecológico, ya que poblaciones silvestres de este acocil fueron encontradas en ríos del centro de Tamaulipas (Bortolini *et al.*, 2007).

De acuerdo a Cook *et al.* (2001), *C. quadricarinatus* es capaz de impactar poblaciones de macroinvertebrados y macrofitas en condiciones de altas densidades. Igualmente, tiene una rápida dominancia frente a otros crustáceos nativos de Australia, como acociles y langostinos palemónidos (Mendoza *et al.*, 2011). Las amenazas para la diversidad de acociles, son los mismos factores que han afectado a otros organismos acuáticos (Allan y Flecker, 1993). Esto incluye pérdida de hábitat y

degradación, sobre-explotación, introducción de especies no nativas, enfermedades y parásitos asociados llevados por especies exóticas (Holdich, 2002).

La introducción de especies no nativas que son usualmente intencionales, con el fin de aprovecharlas como fuente de alimento o no intencionales para ser usadas como cebo en la pesca deportiva o mascotas de acuario (Taugbol y Skurdal, 1999; Lodge *et al.*, 2000). El movimiento mundial de varias especies de acociles ha sido responsable de la transferencia de la plaga devastadora (*Aphanomyces astaci*) la cual ha llevado a mortalidades inexplicables y la extinción de varias poblaciones de acociles nativos de Europa (Alderman y Polglase, 1988). Entre otras enfermedades que afectan a los acociles son causadas por diferentes clases de virus. De acuerdo a Bortolini *et al.* (2005) y Mendoza-Alfaro *et al.* (2011), la presencia de *C. quadricarinatus* en ambientes silvestres de México, como en Tamaulipas y Morelos, representa un riesgo por los efectos ecológicos y económicos, destacando la transmisión de enfermedades virales, como el virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés). Este es un virus con ADN de cadena doble y patógeno importante en la acuicultura de camarones peneidos. Este fue descubierto en Taiwán en 1992 y rápidamente se diseminó en países que cultivan camarón del sureste de Asia, Centro y Sudamérica (Takahashi *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1995; Kong y Yang, 1995; Wang *et al.*, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Rosenberry, 2000; Shi *et al.*, 2005).

El virus WSSV infecta a numerosas especies de crustáceos decápodos incluyendo camarones (*Penaeus monodon* y *Litopenaeus vannamei*), langostinos, cangrejos, acociles y langostas (Lightner, 1996; Chu-Fang *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1998; Shankar y Mohan 1998; Huang y Song, 1999; Otta *et al.*, 1999; Corbel *et al.*, 2001; Edgerton *et al.*, 2009; Shu *et al.*, 2009; Stentiford *et al.*, 2009; Balakrishnan *et al.*, 2011; Gunalan *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2011; Soowannayan y Phanthura, 2011; Costa *et al.*, 2012; Moser *et al.*, 2012).

En los acociles, el WSSV ha sido asociado con mortalidades en *Procambarus* sp. y *Orconectes punctimanus* (Richman *et al.*, 1997); también en *P. clarkii* y *Cherax destructor albidus* (Shi *et al.*, 2005). Recientemente, Baumgartner *et al.* (2009) demostraron la presencia de WSSV en *P. clarkii* y *Procambarus zonangulus* en especímenes silvestres y de cultivo en Louisiana. Stentiford *et al.* (2009), registraron infecciones con WSSV en organismos silvestres de *C. quadricarinatus*.

En México, este virus fue detectado en 1999 en camarones de granjas de cultivo (*Litopenaeus vannamei*) con pérdidas de hasta el 100% (Galaviz- Silva *et al.*, 2004). Ante esta situación y considerando la amplia variedad de crustáceos y otros invertebrados que actúan como hospederos potenciales de WSSV (Yan *et al.*, 2004, 2007; Liu *et al.*, 2007), el acocil australiano *C. quadricarinatus* fue seleccionado para monitorear la presencia de WSSV en granjas de Tamaulipas, esto es considerando su estatus de exótico y portador potencial de este virus. Los resultados mostraron que en solo una granja, los acociles fueron positivos a WSSV. La detección de WSSV por PCR amplificó un fragmento de 401 pares de bases correspondiente al genoma del virus. Parte de este fragmento fue clonado y secuenciado (Acceso GenBank: KC417309.1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC417309>) y tuvo homologías de 99% con aislados del WSSV de origen asiático, que concuerda con los resultados de Hasson *et al.*, (2006), donde indican que camarones de origen chino e importados hacia el Golfo de México y Texas resultaron positivos a WSSV. Por otra parte, la homología del WSSV de *C. quadricarinatus* con aislados asiáticos es validado por los resultados de Molina-Garza *et al.*, (2008), quienes también encontraron homología en los genes de la nucleocapside y cubierta proteica de aislados de WSSV de camarones de México y de China y Taiwán registrados en GenBank.

Este hallazgo es el primer registro de infección natural de *C. quadricarinatus* por WSSV en México y consecuentemente este virus es un riesgo latente de transmisión a especies nativas de crustáceos decápodos de Tamaulipas y de áreas geográficas cercanas. La principal ruta de dispersión de WSSV ha sido el movimiento continuo de camarones, pero en los Estados Unidos de América, se sospecha que la infección de WSSV pudo haberse originado por el manejo y uso de residuos de camarones congelados de origen asiático en plantas procesadoras (Lightner *et al.*, 1997). Probablemente, el origen de infección de WSSV en *C. quadricarinatus* de Tamaulipas podría ser el mismo, pero también se debería considerar otros mecanismos de infección, transmisión entre especies de crustáceos decápodos (Edgerton, 2004; Longshaw, 20011) y través del agua (Chou *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998). En la literatura no se registra datos de prevalencia de infecciones naturales de WSSV en *C. quadricarinatus*, en este estudio la prevalencia, considerando ambas granjas fue del 15% y se estimó con base a la prueba de PCR.

Diferentes especies de crustáceos decápodos marinos, estuarinos y de agua dulce han sido infectados experimentalmente vía inyección o por medio de alimento para evaluar la susceptibilidad a WSSV (Shi *et al.*, 2000; Edgerton, 2004; Jiravanichpaisal *et al.*, 2001, 2004; Yan *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2009; Bateman *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). La infección experimental de WSSV en *P. clarkii* provocó una mortalidad de 82 al 100 %, al segundo día de la inyección del virus (Shi *et al.*, 2000). Unzueta *et al.* (2004) infectaron experimentalmente a *L. vannamei* y *C. quadricarinatus* obteniendo sobrevivencia del 50% en *L. vannamei* y 85% en *C. quadricarinatus*. En este estudio, las pruebas experimentales de infección de WSSV en *C. quadricarinatus*, partieron de utilizar al acocil rojo *P. clarkii* como reservorio del WSSV a través de muestras infectadas del camarón marino *L. vannamei*, la infección fue exitosa y confirmada por PCR. El acocil rojo es considerado un modelo biológico exitoso para la replicación del virus y proveen grandes cantidades de purificados de partículas virales (Huang *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2007). Posteriormente, especímenes de *C. quadricarinatus* fueron infectados por inyecciones de dosis en μL del purificado viral obtenido de la hemolinfa de *P. clarkii*, las cuales fueron exitosas y confirmadas por PCR tiempo real. De acuerdo a la prueba Probit, la L_{50} fue 23.776 ng/ μL con organismos de 18 g de peso en promedio, a los 30 días postinfección. En *C. destructor albidus* y *C. quadricarinatus*, se logró una infección experimental exitosa al alimentar o inyectar a estos acociles con tejidos contaminados de *Penaeus monodon* y la mortalidad puede ser del 100% (Edgerton, 2004; Soowannayan y Phanthura, 2011).

La examinación citopatológica de *C. quadricarinatus* confirma la infección viral de WSSV, este virus infecta las células del epitelio cuticular (Lightner, 1996 Richman *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998; Unzueta *et al.*, 2003), las cuales presentaron cuerpos de inclusión Coudry tipo A, eosinofílicos o basofílicos intracelulares. En etapas tempranas se manifestó hipertrofia nuclear en las células dañadas y fueron principalmente eosinofílicas y en etapas tardías fueron basofílicas. Las células tuvieron una cromatina marginal notable, atrofia nuclear y pignosis. Los especímenes infectados no presentaron las manchas blancas en el exoesqueleto, como es característico en los camarones peneidos con WSSV (Lightner *et al.*, 1996), sin embargo, su ausencia no descarta una probable infección al virus WSSV (Lightner *et al.*, 1996; Soowannayan y Phanthura, 2001).

En la granja positiva a WSSV, se tuvo poco crecimiento y aletargamiento de los acociles, pero sin tener mortalidades importantes. Estudios previos de infecciones experimentales de WSSV en *C. quadricarinatus*, los especímenes infectados también manifestaron inactividad, poco crecimiento y mortalidades bajas (Anderson y Prior, 1992; Romero y Jiménez, 2002; Soowannayan y Panthura, 2001).

Se ha mencionado que el desarrollo de la acuicultura ha facilitado una mejora en el conocimiento de las enfermedades de acociles, particularmente por infecciones virales (Alderman y Polglase, 1988). Sin embargo, facilita un ambiente más eficiente para la transmisión de muchos patógenos y expresiones de enfermedades asociadas (Evans y Edgerton, 2002). La detección del virus WSSV en acociles de agua dulce tiene implicaciones para el futuro y el desarrollo de la acuicultura a escala comercial. Acuicultores de acociles en regiones donde el WSSV está ampliamente diseminado deben estar conscientes del riesgo de WSSV y tener estrategias en el manejo de la enfermedad viral. Monitoreos sanitarios con regularidad para detectar WSSV tendrán que implementarse en las granjas de cultivo de acociles, ya que no se observa sintomatología externa y solamente con análisis de laboratorio podrán detectarse estas infecciones virales.

8. CONCLUSIONES

Se reporta al virus del síndrome de la mancha blanca causando infecciones naturales en *C. quadricarinatus* por primera vez en una granja de cultivo del Estado de Tamaulipas.

Se demostró mediante pruebas por PCR, la presencia del mencionado virus del cual fueron aislados fragmentos de ADN correspondientes a su genoma.

Se concluye que *C. quadricarinatus* puede funcionar como reservorio de mancha blanca, algunas veces sin presentar síntomas macroscópicos aparentes como manchas en el cuerpo o cambios de coloración en el exoesqueleto, esto a diferencia del daño mayor que causa en camarones de agua salada.

En los análisis de secuencia del fragmento de 270 pb aislado por PCR perteneciente al ADN de WSSV, presentó homología con los aislados asiáticos.

9. RECOMENDACIONES

Implementar medidas de bioseguridad en las granjas de cultivo de *Cherax quadricarinatus*, así como las buenas prácticas de producción acuícola que están muy relacionadas con la sanidad acuícola.

Se recomienda hacer un monitoreo para detección de WSSV de las especies de acociles que se encuentran en el medio silvestre, y debe ser considerado de importancia ecológica ya que si el virus está presente es posible que otras especies de organismos acuáticos sean portadores.

Realizar estudios de otras enfermedades de importancia ecológica como la provocada por el hongo *Aphanomyces astasi* que se menciona en la literatura como la plaga del acocil, ya que existe relativamente poca información de organismos de las especies existentes en América.

Hacer estudios inmunológicos de *C. quadricarinatus* para reforzar el conocimiento acerca de los mecanismos de defensa utilizados por esta especie contra patógenos que causan enfermedades.

10. LITERATURA CITADA

Alderman, D. J. y J. L. Polglase. 1988. Pathogens, parasites and commensal. In: B. Edgerton, L. Evans, F. Stephens & R. Overstreet (eds.). Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms, Aquaculture 206 pp. 57-135. doi:10.1016/S0044-8486(01)00865-1.

Allan, J. D. y A. S. Flecker. 1993. Biodiversity conservation in running waters. Bioscience. 43, 1; Research Library pg. 32.

Alvarez, F., J.L. Bortolini. J.L. Villalobos & L. García. 2014. La presencia del acocila australiano *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) en México. In: Low-Pfeng A.M., P.A. Quijón & E.M. Peters-Recagno (Eds.). *Especies Invasoras acuáticas: Casos de estudio en ecosistemas de México*. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Primera edición, México, pp. 603-622.

Anderson, I. G. y C. Prior. 1992. Baculovirus infections in the mud crab, *Scylla serrata*, and a freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, from Australia. In: Journal of Invertebrate Pathology 60: 265-273.

Arredondo, J. L. 2004. Ventajas y desventajas de la introducción del acocil australiano *Cherax quadricarinatus* en México. IV Reunión Nacional. Dr. Alejandro Villalobos F. Instituto de Biología, UNAM.

Balakrishnan, G., S. Peyail, R. Kumaran, A. Theivasigamani, K. Anil-S., S. Jitesh-B. & N. Srinivasan. 2011. First report on White Spot Syndrome Virus (WSSV) infection in white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae) under semi intensive culture condition in India. International Journal of the Bioflux Society, 4: 301-305.

Baumgartner, W.A., J.P. Hawke, K. Bowles, P.W. Varner & K.W. Hasson. 2009. Primary diagnosis and surveillance of white spot syndrome virus in wild and farmed crawfish (*Procambarus clarkii*, *P. zonangulus*) in Louisiana, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 85: 15-22. doi: 10.3354/dao02051.

Bateman, K. S., Venegas, C. A., Stentiford, G. D. y S. W. Feist. 2005. *Cherax quadricarinatus* bacilliform virus (CqBV) infection in redclaw freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* from Chile. Sixth International Crustacean Congress. Abstract 121.

Bateman, K.S., J. Munro, B. Uglow, H.J. Small & G.D. Stentiford. 2012. Susceptibility of juvenile European lobster *Homarus gammarus* to shrimp products infected with high and low doses of white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 100: 169-184. DOI: 10.3354/dao02474.

Bortolini, J. L., Álvarez. F. y A. G. Rodríguez. 2007. On the presence of the Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* in México. *Biol. Invasions*, 9(5): 615- 620. doi: 10.1007/s10530-006-9054-0.

Cai, S. J., Wang, C., Song, X., Yu, J. y C. Zhang. 1995. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. *J. Fish China* 19, 112-1171, in Chinese.

Campos, E., y S. Contreras- Balderas. 1985. First record of *Orconectes virilis* (Hagen) (Decapoda: Cambaridae) from México. *Crustaceana* 49: 218-219.

Chang, P.S., H.C. Chen & Y.C. Wang. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture*, 164: 233-242. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00189-6.

Chou H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang & C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23:165–173. doi: 10.3354/dao023165.

Cook. B., Choy, S., y J. Davie. 2001. Potential ecological impacts of translocating redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Online abstracts. [www. Vims.edu/tcs/ICC5 abstracts.htm](http://www.Vims.edu/tcs/ICC5abstracts.htm).

Corbel, V., Zuprizal, S. Z., Huang, Z., Arcier, J. M. y J. R. Bonami. 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of fish Diseases* 24(7):377-382. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2001.00302.x.

Costa S.W., L.R.M. Vicente, T.M. Souza, E.R. Andreatta & M.R.F. Marques. 2010. Par metros de cultivo e a enfermidade da mancha-branca em fazendas de camar es de Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 45(12): 1521-1530. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010001200025>.

Costa S.W., A.P.M. Fraga, A.S. Zamparetti, M.R.F. Marques & E.R. Andreatta. 2012. Presence of the white spot syndrome virus (WSSV) in wild decapods crustaceans in coastal lagoons in southern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 64(1): 209-216. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352012000100030>.

Crandall, K. A., Fetzner, J. W. Jr., Lawder, S. H., Kinnersley, M. y K. M. Austin. 1999. Phylogenetic relationships among the Australian and New Zealand genera of freshwater crayfishes (Decapoda : Parastacidae). *Australian Journal of Zoology* 47(2) 199 – 214.

Cuellar-Anjel, J. 2013. Enfermedad de las manchas blancas: Síndrome de las manchas blancas. *The Center for Food Security & Public Health and Institute for International Cooperation in Animal Biologics*, Iowa State University, 5 pp.

Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. 2005a. Disease strategy: White spot disease (Versión 1.0). En: Australian Aquatic Veterinary Emergency Plan (AQUAVET PLAN). Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. Canberra, 75 pp. 88.

Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, 2012. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El estado mundial de la pesca y acuicultura.

D.M. Holdich (Eds.). *Biology of Freshwater Crayfish*, Oxford, UK: Blackwell Scientific, pp. 377-438. DOI: 10.1651/0278-0372(2002)022[0969:BOFC]2.0.CO;2.

Du, H.H., L.L. Fu, Y.X. Xu, Z.S. Kil & Z.R. Xu. 2007. Improvement in a simple method for isolating white spot syndrome virus (WSSV) from the crayfish *Procambarus clarkii*. *Aquaculture*, 262: 532-534. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.11.002.

Durand, S. y 5 Coautores. 1996. Application of gene probes as diagnostic tool for the white spot baculovirus (WSSV) of penaeid shrimps. *Diseases of Aquatic Organisms* 27:59-66.

Durand, S., Lightner, D. V. Redman, R. M. y J. R. Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 29:205-211.

Edgerton, B. 1996. A new bacilliform virus in Australian *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae) with notes on *Cherax quadricarinatus* bacilliform virus (= *Cherax baculovirus*). *Diseases of Aquatic Organisms* 27:43–52.

Edgerton, B.F. 2000. A compendium of idiopathic lesions observed in redclaw freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Journal of Fish Diseases*, 23: 103-113. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2000.00216.x.

Edgerton, B.F., R. Webb, I.G. Anderson & E.C. Kulpa. 2000. Description of a presumptive hepatopancreatic reovirus, and a putative gill parvovirus, in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 41: 83-90. DOI: 10.3354/dao041083. 89.

Edgerton, B.F., L.H. Evans, F. J. Stephens & R.M. Overstreet. 2002. Synopsis of Freshwater Crayfish Diseases and Commensal Organisms. *Aquaculture*, 206 (1-2): 57-135. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00865-1.

Edgerton, B. F., Watt, H., Bacheras, J. M. y J. R. Bonami. 2002. An intracellular bacilliform virus associated with near extirpation of *Austropotamobius pallipes* from the Nant watershed in Ardèche, France. *Journal of Fish diseases* 25:523-531.

Edgerton, B., Evans, L. H., Frances, J. S. y M. O. Robin. 2002. Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. *Aquaculture*. 206, 57- 135.

Edgerton, B. F., Evans, L. H., Stephens, F. J. y R. M. Overstreet. 2002a. Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. *Aquaculture*. 206, 57-135.

Edgerton, B. F., Watt, H., Becheras, J. M. y J. R. Bonami. 2002b. An intranuclear bacilliform virus associated with near extirpation of *Austropotamobius pallipes* Lereboullet from the Nant Watershed in Archèche, France. *J. Fis Dis.* 25, 523-531.

Edgerton, B. F. 2003. Further studies reveal that *Austropotamobius pallipes* bacilliform virus (ApBV) is common in populations of native freshwater crayfish in south-eastern France. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 23:7-12.

Edgerton B.F. 2004. Susceptibility of the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor albidus* to white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 59(3): 187-193. DOI: 10.3354/dao059187.

Edgerton, B. F., Henttonen, P., Jussila, J., Mannonen, A., Passonen, P., Taugbol, T. Edsman, L. y C. Souty-Grosset. 2004. Understanding the Causes of Disease in European Freshwater Crayfish. Centre for Marine Studies, University of Queensland 4072, Australia. Vol. 18, No. 6, December 2004. *Conservation Biology*, Pages 1466-1474.B.

Edgerton, B. F. 2005. Freshwater crayfish production for poverty alleviation. *World Aquaculture* 36 (2): 48-55.

Evans, L.H. & B.F. Edgerton. 2002. Pathogens, parasites and commensals. *In*: D.M. Holdich (Eds.). *Biology of Freshwater Crayfish*, Oxford, UK: Blackwell Scientific, pp. 377-438. DOI: 10.1651/0278-0372(2002)022[0969:BOFC]2.0.CO;2.

Fei Zhu a, Huahua Du a, Zhi-Guo Miao b, Hai-Zhi Quan a, Zi-Rong Xu a, 2009. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using inactivated WSSV.

Fetzner Jr. J. W. 2008. The Crayfish et lobster Taxonomy Browser. www.iz.carnegiemnh.org/crayfish/NewAstacidea/index.asp.

Flegel, T. W. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 258: 1-33.

Flegel, T.W. 2009. Current Status of Viral Diseases in Asian Shrimp Aquaculture. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 61(3): 229-239. <http://hdl.handle.net/10524/19291>.

Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L. y F. Brown. 1991. Clasification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Pp 450.

Galaviz-Silva, L., . . Molina-Garza, . . Alcocer-Gonzalez, .L. Rosales-Encina .C. Ibarra-Gomez. 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture*, 242: 53-68. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.09.006.

Garza de Yak, A. 2016. Aquaculture: Developing markets for a new product aquacultured redclaw in Mexico. *In*: Kawai T. & Faulkes Z. (Eds.). *Freshwater 91 Crayfish: A Global Overview*. CRC Press Taylor & Francis Group, New York, pp. 161-181.

Groff, J. M., McDowell, T., Friedman, C. S. y R. P. Hedrick. 1993. Detection of a nonoccluded baculovirus in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* in North America. *Journal of Aquatic Animal Health* 5:275–279.

Gunalan B., P. Soundarapandian, K. Ramchandran, T. Anand & A.S. Kotiya. 2011. First report on White Spot Syndrome Virus (WSSV) infection in white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae) under semi intensive culture condition in India. *AACL Bioflux*, 4(3): 301-305.

Hai-peng Liu, Rong-yuan Chen, Qiu-xia Zhang, Hui Peng, Ke-jian Wang. 2011. Differential gene expression profile from haematopoietic tissue stem cells of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in response to WSSV infection.

Hasson K.W., Y. Fan, T. Reisinger, J. Venuti, & P.W. Varner. 2006. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71: 91–100. DOI: 10.3354/dao071091.

Hasson, KW., Fan, Y., Reisinger, T., Venuti, J. y P. W. Varner. 2008. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater 92 systems through imported, frozen bait-shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. Ed. Inter Reserch. Vol. 91 71- 100.

Hauck, A. K., Marshall, M. R., Li, J. K. K. y R. A. Lee. 2001. A new finding and range extension of bacilliform virus in the freshwater red claw in Utah, USA. *Journal of aquatic Animal Health* 13: 158-162.

Hobbs, H.H., Jr. 1984. On the distribution of the crawfish genus *Procambarus* (Decapada: Cambaridae). *J. Crust. BioI.* 41: 12-24.

Hobbs, H.H., Jr. 1988. Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution. *In*: D.M. Holdich and R.S. Lowery (eds.) *Freshwater crayfish: Biology, Management and Exploitation*. Croom Helm, London, pp. 52-82.

Hobbs, H. H., Jr. 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 480:1–236.

Holdich, D. M. 2002b. *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.

Holdich, D. M. 2002. Distribution of cryfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin Francais de la Peche et de la pisciculture* 367:611-650.

Horwitz, P. 1990. The translocation of freshwater cryfish in Australia: Potential impact, the need for control and global relevance. *Biological Conservation*. 54, 291-305.

Huang J., X.L. Song, J. Yu & C.H. Yang. 1995. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis-study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. *Marine Fisheries Research*, 16: 1-10.

Huang C.C., & Y.L. Song. 1999. Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Developmental & Comparative Immunology*, 23: 545-552. doi: 10.1016/S0145-305X(99)00038-5.

Huang, T-S., Cerenius, L. y K. Söderhäll. 1994. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* 126:1–10.

Huang, R., Xie, Y., Zhang , J. y Z. Shi. 2005. A novel envelope protein involved in White spot syndrome virus infection. *J Gen Virol* 86: 1357–1361. 93.

Huner, J. V. 1994. *Freshwater cryfish aquaculture in North America, Europe and Australia: families Astacidae, Cambaridae and Parastacidae*. Haworth Press Inc. pp. 220-263.

Inouye, K., Miwa, S., Oseco, N., Nakano, H., Kimura, T., Momoyama, K. y M. Hiraoka. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology*. 29:149-158.

Inouye, K., Yamano, K., Ikeda, N., Kimura, T., Nakano, H., Momoyama, K., Kobayashi, J. y S. Miyajima. 1996. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.* 31, 39-45.

James, W. Fetzner Jr. y Robert, DiStefano. 2008. Population Genetics of an Imperiled Crayfish from the White River Drainage of Missouri, USA. *International Association of Astacology* ISBN: 978-0-9581424-8-9 print / 978-0-9805452-0-3 online.

Jiravanichpaisal P., E. Bangyeekhun, K. Söderhall & I. Söderhall. 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47: 151-157. DOI: 10.3354/dao047151.

Jiravanichpaisal P., K. Söderhall & I. Söderhall. 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish and Shellfish Immunology*, 17: 265-275. DOI: 10.1016/j.fsi.2004.03.010.

Kasornchandra, J., y S. Boonyaratpalin. 1996. Res disease with white patches or white spot disease in cultured penaeid shrimp in Asia. *Asian Shrimp News* 273(3): 4.

Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S. y T. Itami 1998. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164: 243-251.

Kanchanaphum, P; Wongteerasupaya, C., Sitidilokratana, N., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. y T. W. Flegel. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34: 1-7. 94.

Karunasagar. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38: 67-70. DOI: 10.3354/dao038067.

Kim, W. y L. G. Abele. 1990. Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18s rRNA nucleotide sequences. *J. Crustacean Biol.* 10:1-13.

Lafferty, K. D. y L. R. Gerber. 2002. Good medicine for conservation biology: the intersection of epidemiology and conservation theory. *Conservation Biology* 16:593-604.

Lawrence C., & C. Jones. 2002. *Cherax*. In: Holdich D.M. (Eds.). *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, Oxford, pp. 635–669. DOI: 10.1651/0278-0372(2002)022[0969:BOFC]2.0.CO;2.

Li D.F., M.C. Zhang, H. J. Yang, Y.B. Zhu & X. Xu. 2007. Beta-integrin mediates WSSV infection. *Virology*, 368(1): 122-132. DOI: 10.1016/j.virol.2007.06.027.

Lightner, D. V. 1985. A review of the diseases of cultured penaeid shrimp and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. Pp 79-103. In: *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/shrimps*. Y. Yaki, J. H. Primavera, J. A. Llobrera (Eds). Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Iloilo, Philippines.

Lightner D.V. & R.M. Redman. 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45: 47-53. doi:10.1016/0022-2011(85)90048-5. 95.

Lightner, D. V. 1996. Epizootiología y diseminación de dos virus de los camarones peneidos en las Américas y su impacto sobre el comercio internacional. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 15:579-602.

Lightner, D.V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultures Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society , Baton Rouge, Louisiana, USA. Pp. 256.

Lightner, D. V., Redman, R. M., Poulos, B. T., Nunan, L. M., Mari, J. L. y K. W. Hasson. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Revue Scientifique et Technique Office International des Épidémiologies* 16: 146-160.

Lightner, D. V. y R. M. Redman. 1998. Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathology* 33: 165-180.
<http://doi.org/10.3147/jsfp.33.165>.

Lo, C.F., C.H. Ho, S.E. Peng, C.H. Chen, H.E. Hsu, Y.L. Chiu, C.F. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, C.H. Wang & G.H. Kou. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27: 215-225. doi:10.3354/dao027215.

Lo, C. F., Kou, G. H., Leu, J. H., Ho, C. H., Chen, C. H., Peng, S. E., Chen, T. T., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Huang, C. J., Chou, H. Y. y C. H. Wang. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25:133-141.

Lo, C. F., y diez coautores. 1997. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*.

Lo, C. F. y G. H. Kou. 1998. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathology* 33:365-371. 96.

Lo, C.F., S.E. Penouarn, Y.S. Chang & G.H. Kou. 2005. White Spot Syndrome - What we have learned about the virus and the disease. In: P. Walker, R. Lester & M.G. Bondad-Reantaso (Eds). *Diseases in Asian Aquaculture V. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila*, pp. 421-433.

Longshaw, M. 2011. Diseases of crayfish: a review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 54–70. doi: 10.1016/j.jip.2010.09.013.

Marques .S., I.C. Iler, J.R. Moser, T.C. Sincero & M.R.F. Marques. 2011. Wild captured crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), a new host for white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 318(1-2): 20-24. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.031.

Martin, J. y G. Davis. 2001. An updated classification of the recent Crustacea. Nat. Hist. Mus. Los Angeles County, Sci. Ser., 39: 132 pp.

Masser, M. P. y B. Rouse. 1997. Australian red claw crayfish, Southern Regional Aquaculture Center (224), 1-8 pp. (en línea). www.aquanic.org/publicat/usda_srac/244fs.pdf.

Mendoza- Alfaro, R., Ramirez- Martínez, C., Aguilera- González. C. y M. E. Meave-del Castillo. 1999. Especies Acuáticas Invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 43-73.

Mendoza R.E., G.A. Rodríguez-Almaraz S.A. Castillo-Alvarado. 2011. Riesgo de dispersión y posibles impactos de los acociles australianos del género *Cherax* en México. (Conabio), México. 140 p. DOI: 10.13140/2.1.4722.7528.

Molina-Garza Z.J., L. Galaviz-Silva, J.L. Rosales-Encinas, & J.M. Alcocer-González. 2008. Nucleotide sequence variations of the major structural proteins (VP15, VP19, VP26 and VP28) of white spot syndrome virus (WSSV), a pathogen of cultured *Litopenaeus vannamei* in Mexico. *Journal of Fish Diseases*, 31(3): 197-203. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00891.x.

Moser J.R., D.A.G. Álvaremmz, F.M. Cano, T.E. Garcia & D.E.C. Molina. 2012. Water temperature influences viral load and detection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*, 326-329: 9-14. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.10.033.

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Gabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. y M. D. Summers. 1995. Classification and nomenclature of virus. *Archives of Virology*. 10: 1-586.

Nishikawa, S. I., Fewell, S. W., Kato, Y., Brodsky, J. L. y T. Endo. 2001. Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol* 153(5):1061-70.

Nunan, L. M., y D.V. Lightner. 1997. Development of a non radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*. 63: 193-201. Nunan, L. M., B. T. Poulos y D. V. Lightner. 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture* 160:19-30.

Nunan L.M., B.T. Poulos, & D.V. Lightner. 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, 160: 19-30. DOI:10.1016/S0044-8486(97)00222-6.

Otta S.K., G. Shubha, B. Joseph, A. Chakraborty, I. Karunasagar & I. Karunasagar. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38: 67-70. DOI: 10.3354/dao038067. 98.

Otta, S. K., Shubha, G., Joseph, B., Chakraborty, A. y Karunasagar.1999. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38 Páginas: 67 – 70.

Passonen, P., Edgerton, B., Tapiovaara, H., Halonen, T. y P. Henttonen. 1999. Freshwater cryfish virus research in Finland:state of the art. Pages 177-187 in T.

Peng, S. F., Lo, C. F., Liu, K. F. y G. H. Kou.(1998): The transition from pre-patent to patent infection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon* triggered by pereopod excision. *Fish Pathology*, 33: 395-400.

Pearson W.R. & D.J. Lipman. 1988. FASTA searches a protein or DNA sequence data Bank version 36.6.6 Jan, 2014. *PNAS* 85: 2444-2448.

Ponce-Palafox J. T., J.L. Arredondo-Figueroa & X. Romero. 1999. Análisis del cultivo comercial de la langosta de agua dulce (*Cherax quadricarinatus*): y su posible impacto en América Latina. *Contactos*, 31: 54-61.

Richman, L. K., Montali, R. J., Nichols, D. K. y D. V. Lightner. 1997. Abstract: a newly recognized fatal baculovirus infection in freshwater cryfish. In Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians. American Association of Zoo, Veterinarians, 262-264.

Rodríguez-Almaraz, G.A., y E. Campos. 1994. Distribution and status of the crayfishes (Cambaridae) of Nuevo León, Mexico. *Journal of Crustacean Biology* 14: 729-735.

Rodríguez-Almaraz, G.A., González-Aguilar, J. A. y R. Mendoza-Alfaro. 1997. Biological and Ecological Notes Palaemonetes suttkusi (Crustacea: Palaemonidae) from Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, México. *Southwestern Naturalist*, 42 (4): 501-503. 99.

Rodríguez-Almaráz, G. A. y R. Muñoz-Martínez. 2008. Conocimiento de los acociles y langostinos del Noreste de México: amenazas y propuestas de conservación, en F. Alvarez y G. Rodríguez-Almaráz (eds.). *Crustáceos de México: estado actual de su conocimiento*. Dirección de Publicaciones, UANL, pp. 167-206.

Rosenberry, B. 2000. World Shrimp Farming. *Shrimp News International*, 324 p.

Shankar K.M. & C.V. Mohan. 1998. Epidemiological aspects of shrimp viral diseases in India – a review. *Journal of Aquatic Tropical*, 13(1): 43-49.

Shi Z., C. Huang, J. Zhang, D. Chen & J.R. Bonami. 2000. White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Fish Diseases*, 23:285-288. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2000.00232.x.

Romero, X. y R. Jiménez. 2002. Histopathological survey of diseases and pathogens present in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens), cultured in Ecuador. *Journal of fish diseases*. 25: 653-667. DOI:10.1046/j.1365-2761.2002.00411.x.

Sambrook, J. y D. Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, pp. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shankar, K.M. y C.V. Mohan. 1998. Epidemiological aspects of shrimp viral diseases in India – a review. *J. Aqua. Trop.* 13(1):43-49.

Shi, Z., Huang, C., Zhang, J., Chen, D., y J. R. Bonami. 2000. White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Fish Diseases* 23:285-288.

Shi, Z., Wang, H., Zhang, J., Xie, Y., Li, L., Chen, X., Edgerton, B.F. y Bonami, Jr. 2005. Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.* 28, 151-156.doi:10.1111/j.1365-2761.2004.00607.x.

Song X., J. Huang, C. Wang, J. Yu, B. Chen & C. Yang. 1996. Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *Journal of Fisheries of China*, 20(4): 374-378.

Soowannayan C. & M. Phanthura. 2011. Horizontal transmission of white spot syndrome virus (WSSV) between red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) and the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 319: 5-10. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.06.012.

Sudha, P. M., Mohan, C. V., Shankar, K. M., y A. Hegde. (1998). Relationship between White Spot Syndrome Virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture*. 167:95-101.

Stentiford, G. D., Bonami, J. R. y P. Alday-Sanz. 2009. A critical review on susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European Legislation. *Aquaculture* 291, 1-17. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.02.042.

Takahashi Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fujii, S. Tomonaga, K. Supamattaya & S. Boonyaratpalin. 1994. Electron microscopy evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus laponicus*). *Fish Pathology*, 29: 121-125. <http://doi.org/10.3147/jsfp.29.121>.

Torres-Montoya, E.H., V.M. Salomón-Soto, M. Bucio-Pacheco, J.I. Torres-Avendaño, M. López-Ruiz, S. Sánchez-González & H. Castillo-Ureta. 2016. Primer registro de poblaciones silvestres de *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87:258-260. doi:10.1016/j.rmb.2016.01.001.

Unzueta .L., R. Silveira, A.A. Prieto, G. Aguirre R. V zquez. 2004. Susceptibilidad de *Litopenaeus schmitti* y *Cherax quadricarinatus* al virus del 101síndrome de la mancha blanca (WSSV). *Ciencias Marinas*, 30(4): 537-545. DOI: <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v30i4.344>.

Taugbol T. y J. Skurdal. 1999. The future of native crayfish in Europe: how to make the best of a bad situation. In: *Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?* (eds. F. Gherardi y D. M. Holdich). Pp. 271-9. A. A. Bakeman Rotterdam.

Tang, K-Nelson y D. V. Lightner. 2001. Development of real-time PCR assays for detection of white spot syndrome virus, yellow head virus, Taura syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721.

Tang, K-Nelson y D. V. Lightner. 2004. Quantitation of Taura syndrome virus by real time RT-PCR with a Taqman assay. Journal of virological methods. Pages. 109-114.

Taylor, C. A., Warren Jr., M. L., Fitzpatrick Jr., J. F., Hobbs, H. H. III., Jezerinac, R. F., Pflieger, W. L., y H. W. Robison. 1996. Conservation status of crayfishes of the United States and Canada. Fisheries 21(4):25–38.

Taylor, C. A. 2002. Taxonomy and Conservation status of native crayfish stocks. Page 236-257 in D. M. Holdich, editor. Biology of freshwater cryfish. Blackwell Science, Oxford United Kingdom.

Takahashi, Y., Itami, T., Kondo, M., Maeda, M., Fijii, R., Tomonga, S., Supamattaya, K., y S. Booyaratpalin. (1994). Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). Fish Pathology. 19: 121-125.

Takahashi, Y., Itami, T., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., Khongpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., Kusuda, R., Hirono, I. y T. Aoki. 1996. Polimerase chain reaction (PCR) amplification of Bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. Journal of Fish Diseases 19: 399-403.

Torres, E. y F. Álvarez. 2011. Genetic variation in native and introduced populations of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Crustacea, Decapoda, Cambaridae) in Mexico and Cost Rica. Aquatic Invasions 7:235-241.

U.S. Department of Commerce. 1997. The regional economic information system [CD-ROM]. U.S. Department of Commerce, Bureau of Economic Analysis, Regional Economics Measurement Division, Washington, DC.

Unzueta .L., R. Silveira, A.A. Prieto, G. Aguirre R. V zquez. 2004. Susceptibilidad de *Litopenaeus schmitti* y *Cherax quadricarinatus* al virus del síndrome de la

mancha blanca (WSSV). *Ciencias Marinas*, 30(4): 537-545. DOI: <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v30i4.344>.

Van Hulten, M.C., J. Witteveldt, M. Snippe & J.M. Vlak. 2001. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*, 285(2): 228-33. DOI: 10.1006/viro.2001.0928.

Vázquez, F.J., & G.L. López. 2007. Diferenciación sexual en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Revista de Biología Tropical*, 55: 33-38. DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v55i0.5803>.

Vlak J.M., J.R. Bonami, T.W. Flegel, G.H. Kou, D.V. Lightner, C.F. Lo, P.C. Loh & P.J. Walker. 2004. Nimaviridae. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L.A. Ball (Eds.). *Virus Taxonomy*, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London. 187-192 pp. 103.

Villalobos, A. 1955. *Procambarus zapoapensis*. Instituto de Biología. *IBUNAM:CNCR:CR437*". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2008-09-26.

Villalobos-Hiriart, J. L., Cantú Díaz-Barriga, A. y E. Lira-Fernández. 1993. Los crustáceos dulceacuícolas de México. In *Diversidad biológica en México*, R. Gío-Argáez y E. López-Ochoterena (eds.). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, volumen especial 64:267-290.

Wang, C. H., Lo, C. F., Leu, J. H., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Chou, H. Y., Tung, M. C., Chang, C. F., Su, M. S. y G.H. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBS) of *Penaeus monodon*. *Disease of Aquatic Organisms* 23:239-242.doi:10.3354/dao023239.

Wang, Yu-Chi., Chu-Fang Lo. Poh-Shing Chang, Guang-Hsiung Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus insome cultured and silg decapods in Taiwan. *Aquaculture* 146:221-231.doi:10.1016/S0044-8486(98)00188-4.

Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Alarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarkul B. y T.W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 21: 69-77.doi:10.3354/dao021069.

Yan D.C., S.L. Dong, J. Huang, X.M. Yu, M.Y. Feng & X.Y. Liu. 2004. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp ponds sediments. *Diseases of Aquatic Organisms*, 59: 69-73. DOI: 10.3354/dao059069.

Yan, D. C., Dong, S. L., Huang, J. y J. S. Zhang. 2007. White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish. *J. Invertebr. Pathol.* 94, 144–148. 104.

Yu J., J. Huang, X. Song & C. Yang. 1995. Preparation of monoclonal antibody against hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus of penaeid shrimp. *Marine Fisheries Research*, 16: 24-30.

Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, New Jersey, 718 pp. 105

11. APÉNDICES

APÉNDICE A

Preparación de soluciones (para 1 litro)

TBE 5X

17.52 gramos de ácido bórico 445 mM

70.132 gramos de Tris-HCl 445 mM

10 ml de EDTA 1M.

SB 20X

8 gramos de NaOH 0.2 M

44.98 gramos de ácido bórico 0.7278 M

TE 1X

EDTA 1 mM

Tris-HCl 10 mM

TN 1X

3.14 gr de Tris Hcl 0.02 M

11.79 gr de Nacl .2 M

Davidson AFA

335 ml de agua destilada

330 ml de alcohol etílico

220 ml de formalina

115 ml de ácido acético glacial

Agua acidulada

400 ml de agua destilada

40 gotas de ácido clorhídrico

Agua amoniacal

400 ml de agua destilada

40 gotas de hidróxido de amonio

Hematoxilina de Harris

5 gr de hematoxilina

100 gr de alumbre de potasio

50 gr de alcohol etílico absoluto

1,000 ml de agua destilada

2.5 gr de óxido rojo de mercurio

40 ml de ácido acético

Eosina (sol. madre)

5 gr de eosina

5 ml de ácido clorhídrico

500 ml de agua destilada

Preparación de geles de acrilamida al 8% (20ml)

9.3 ml de agua

5.3 ml de mezcla de acrilamida al 30%

5 ml de Tris 1.15 M (pH 8.8)

200 µl de SDS 19%

200 µl de NH_4SO_3 al 10%

12 µl de TEMED

Preparación de geles de agarosa

Disolver 1.5 gramos de agarosa (grado analítico) en 100 ml de buffer TBE 1X para obtener un gel en una concentración al 1.5%.

APÉNDICE B

Preparación de células *E. coli* calciocompetentes

Preparación de un Stock CaCl_2 1M.- Se disolvió 3.67 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 25 ml de H_2O mili Q, la mezcla fue esterilizada por filtración a través de una membrana de 0.22 μm , seguido de esto se almacenó alícuotas de 5 ml a -20°C .

El día que se prepararon las células competentes, se diluyó una alícuota de 5 ml de CaCl_2 en 50 ml de agua mili Q (0.1 M) que fue esterilizada por filtración 0.22 μm , la solución se mantuvo en hielo a 0°C .

Procedimiento: Para recuperar cultivos de placa, se picó una colonia (2-3 mm de diámetro) en 1 ml de LB, para crecer las células por 16-20 horas a 37°C con agitación suave. Se procedió a inocular con 25 ml de caldo LB con 100 μl del cultivo de 16-20 h de crecimiento. El cultivo fue incubado por 3 horas a 37°C con agitación suave a 200 rpm. Posteriormente se transfirieron las células, bajo condiciones de esterilidad, en un tubo cónico de 50 ml y se enfriaron en hielo por 10 min. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C para luego desechar el medio sin células, se mantuvo invertido el tubo por 1 minuto para eliminar todo el resto del medio. Después, las células se suspendieron en 10 ml de CaCl_2 0.1 M y fueron mantenidas en hielo. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C el líquido fue desechado manteniendo el tubo invertido por 1 minuto. Finalmente las células fueron suspendidas en 1 ml de CaCl_2 0.1 M enfriado en hielo.

NOTA: Las células pueden ser congeladas a -70°C siempre que se guarden con glicerol o almacenarlas a 4°C en hielo por 24-48 horas. La eficiencia de la transformación se incrementa de 4-6 veces durante las primeras 12-24 horas.

Transformación.- Se utilizaron 200 μl de células competentes transfiriéndolas en un tubo estéril de 1.5 ml a las cuales fue agregado el ADN (no más de 50 ng en 10 μl o menos), esto fue mezclado suavemente y se conservó en hielo por 30 min.

Posteriormente los tubos fueron transferidos a 42 ° C por 90 seg sin agitarlos. Rápidamente se transfirió el tubo al hielo, las células se dejaron enfriar 1-2 min. Se agregaron 800 µl de caldo LB e incubó por 45 min con agitación a 37 °C. Por último se transfirieron 200 µl de células transformadas en una placa de agar LB conteniendo ampicilina a una concentración de 50-100 µg/µl.

APÉNDICE C

Secuencias reportadas en el banco de genes, se incluye 401 recortado (secuencia encontrada) comparadas con el programa Clustal IV.

Nombre	Secuencia
487 VN1	----- 10 20 30 40 50 60 70 -----
401 recortado	-----
Shin completo	CTAAAAGATTGACGGAGTTGACCCAGCCTTCCCTGCCGCCCTCACCTGCGCTTCTCACCTCATGCTTTC 70
Taiwancomplet	-----
VN2completo	-----
487 VN1	----- 80 90 100 110 120 130 140 -----
401 recortado	-----
Shin completo	TTCCATGGATTCCCATACAAAGTCATCTTTCATGGACAACATCAAATTGCACATGACTGATACTCAATGC 140
Taiwancomplet	-----
VN2completo	-----
487 VN1	----- 150 160 170 180 190 200 210 -----
401 recortado	-----
Shin completo	TTCTTCAAGAACATTGAACGATTGAGAAATCTTGGGAAGATATGGGGACGAATACGCCATGTCCCACA 210
Taiwancomplet	-----
VN2completo	-----
487 VN1	----- 220 230 240 250 260 270 280 -----
401 recortado	-----
Shin completo	AGCAAAATTGTAAGTCCCCCTTCCATCTCCACCACACTTTTACTCCCTCAGATAACGAGCATCTGGTATC 280
Taiwancomplet	-----TTACTCC-TCAGA-AACGAGCAT-TGGTATC 28
VN2completo	-----
487 VN1	----- 290 300 310 320 330 340 350 -----
401 recortado	-----
Shin completo	CTCTTTCGCATTGCCCCGCCGAGAGTCTCCATGGAAGAAATTAGAGCCACACCCTATCAGGCCAACAAG 350
Taiwancomplet	CTCTTTCGCATTGCCCCGCCGAGAGTCTCCATGGAAGAAATTAGAGCCACACCCTATCAGGCCAACAAG 98
VN2completo	-----
487 VN1	----- 360 370 380 390 400 410 420 -----
401 recortado	-----
Shin completo	CTTATTAGTGACAAACATTACGTGATGAACATGTCCAAGATCGATTCTAGAGTAACAGGATCTTCCCTCC 420
Taiwancomplet	CTTATTAGTGACAAACATTACGTGATGAACATGTCCAAGATCGATTCTAGAGTAACAGGATCTTCCCTCC 168
VN2completo	-----

```

-----
430      440      450      460      470      480      490
487 VN1 ----- 1
401 recortado ----- 1
Shin completo TTAAGAAGGTTAGCGAATGGACTGAAATGAGAAATGAACTCCAACCTTTAATGGAACATTTGAACCATCAAG 490
Taiwancomplet TTAAGAAGGTTAGCGAATGGACTGAAATGAGAAATGAACTCCAACCTTTAATGGAACATTTGAACCATCAAG 238
VN2completo ----- 1

```

```

-----
500      510      520      530      540      550      560
487 VN1 ----- 1
401 recortado ----- 1
Shin completo ACTCGCCCTCTCCAACCTCTGGCATGACAACGGCAGGAGTCAACCTCGACGTTATTGTCAAACCAAATAAT 560
Taiwancomplet ACTCGCCCTCTCCAACCTCTGGCATGACAACGGCAGGAGTCAACCTCGACGTTATTGTCAAACCAAATAAT 308
VN2completo ----- 1

```

```

-----
570      580      590      600      610      620      630
487 VN1 ----- 1
401 recortado ----- 1
Shin completo GCAAGAAGTGTACTAGGAATATTGGAATGTCATCGCCAGCACGTGTGCACCGCCGACGCCAAGGGAACGT 630
Taiwancomplet GCAAGAAGTGTACTAGGAATATTGGAATGTCATCGCCAGCACGTGTGCACCGCCGACGCCAAGGGAACGT 378
VN2completo ----- 1

```

```

-----
640      650      660      670      680      690      700
487 VN1 ----- 1
401 recortado ----- 1
Shin completo TCGCTTCAGCCATGCCAGCCGTCTTCAGGCAACCGATGGAACGGTAACGAATCTGAACTGATCCAGAA 700
Taiwancomplet TCGCTTCAGCCATGCCAGCCGTCTTCAGGCAACCGATGGAACGGTAACGAATCTGAACTGATCCAGAA 448
VN2completo ----- 1

```

```

-----
710      720      730      740      750      760      770
487 VN1 ----- 1
401 recortado ----- 1
Shin completo TGCTCTGCCAAGGAACAGATACATCCAAAAGAGCACAATGAACGCTCAAACCTGTCGTGTTTGCTAATGTT 770
Taiwancomplet TGCTCTGCCAAGGAACAGATACATCCAAAAGAGCACAATGAACGCTCAAACCTGTCGTGTTTGCTAATGTT 518
VN2completo ----- 1

```

```

-----
780      790      800      810      820      830      840
487 VN1 ----- 1
401 recortado ----- 1
Shin completo TTGGAACAACCTTATCGCCGATCTTGGAAGGTTATCGTGAACGAACTGGCCGGCACCATCGCTGAATCTG 840
Taiwancomplet TTGGAACAACCTTATCGCCGATCTTGGAAGGTTATCGTGAACGAACTGGCCGGCACCATCGCTGAATCTG 588
VN2completo ----- 1

```

```

-----
      850      860      870      880      890      900      910
487 VN1 ----- 1
401 recortado ----- 1
Shin completo TACCAGAAAGCGTATATGAAAACACCAAGGAAATGATTGATAGACTAGGCTCTGACGACCTCTTCAAATC 910
Taiwancomplet TACCAGAAAGCGTATATGAAAACACCAAGGAAATGATTGATAGACTAGGCTCTGACGACCTCTTCAAATC 658
VN2completo ----- 1

      920      930      940      950      960      970      980
487 VN1 ----- 51
401 recortado ----- 51
Shin completo TAATAATAATGGAGGAGTAGAATCAATGGATTATGAAGATAGCGAAACAACATCCAACAATGGTCCCGTC 980
Taiwancomplet TAATAATAATGGAGGAGTAGAATCAATGGATTATGAAGATAGCGAAACAACATCCAACAATGGTCCCGTC 728
VN2completo ----- 37

      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
487 VN1 CTCATCTCAGAAGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACACTAATTTCCGGCAAGGCAGCTCGCCCGGAAA 121
401 recortado CTCATCTCAGACGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACACTAATTTCCGGCAAGGCAGCTCGCCCGGAAA 121
Shin completo CTCATCTCAGAAGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACACTAATTTCCGGCAAGGCAGCTCGCCCGGAAA 1050
Taiwancomplet CTCATCTCAGAAGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACACTAATTTCCGGCAAGGCAGCTCGCCCGGAAA 798
VN2completo CTCATCTCAGAAGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACACTAATTTCCGGCAAGGCAGCTCGCCCGGAAA 107

      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
487 VN1 GATATCCTCAACGATATCGAACGTAATATTTCTTCTGACTATACTAACTGTCCACCAAATACTAACC AAA 400
401 recortado ----- 270
Shin completo GATATCCTCAACGATATCGAACGTAATATTTCTTCTGACTATACTAACTGTCCACCAAATACTAACC AAA 1329
Taiwancomplet ----- 894
VN2completo GATATCCTCAACGATATCGAACGTAATATTTCTTCTGACTATACTAACTGTCCACCAAATACTAACC AAA 387

      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
487 VN1 ATGCCTTTGCTCTAGCTATCAAGAGAGAATTGAGCAGAATTGTTTTCTTCTTAACCATTTCTCGTAAGAA 470
401 recortado ----- 270
Shin completo ATGCCTTTGCTCTAGCTATCAAGAGAGAATTGAGCAGAATTG
Taiwancomplet -----TCA 896
VN2completo ATGCCTTTGCTCTAGCTATCAAGAGAGAATTGAGCAGAATTGTTTTCTTCTTAACCATTTCTCGTAAGAA 457

      1410
487 VN1 CATTACACCGCATAG 486
401 recortado ----- 270
Shin completo ----- 1371
Taiwancomplet ----- 896
VN2completo CATTACACCGCAT 471

```

APÉNDICE D

Dosis letal media L50

Probabilidad	95% de confiabilidad por dosis		
	Estimado	Límite inferior	Límite superior
0,01	12,566	244,252	5,216
0,02	8,307	210,716	7,837
0,03	5,605	189,495	9,557
0,04	3,573	173,571	10,89
0,05	1,92	160,65	12,006
0,06	0,512	149,679	12,983
0,07	0,721	140,084	13,864
0,08	1,826	131,516	14,677
0,09	2,831	123,746	15,438
0,1	3,756	116,616	16,16
0,15	7,585	87,397	19,453
0,2	10,628	64733	22,629
0,25	13,239	46,019	26,083
0,3	15,584	30,236	30,208
0,35	17,757	17,071	35,49
0,4	19,818	6,525	42,449
0,45	21,813	1,47	51,39
0,5	23,776	7,322	62,205
0,55	25,739	11,645	74,55
0,6	27,734	14,986	88,145
0,65	29,796	17,729	102,906
0,7	31,968	21,126	118,957
0,75	34,313	22,35	136,641
0,8	36,924	24,541	156,618
0,85	39,927	26,85	180,149

0,9	43,797	29,518	209,992
0,91	44,721	30,135	217,228
0,92	45,726	0,795	225,099

RESUMEN BIOGRÁFICO

Martha Silvia Tirado Velarde

Candidata para el grado de Doctora en Ciencias con Especialidad en
Manejo de Vida Silvestre y Desarrollo Sustentable

Tesis: Incidencia y Susceptibilidad del virus de la mancha blanca (WSSV) en acocil exótico *Cherax quadricarinatus* Von Martens, 1868 cultivado en granjas el noreste de México.

Campo de estudio: Sanidad Acuícola

Datos personales: Nacida en Villa Unión, Mazatlán, Sinaloa el 18 de febrero de 1961. Hija de Francisco Tirado Núñez y Aurora Velarde Salas.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Sinaloa, de la Facultad de Ciencias el Mar. Título obtenido: Lic. en Biología Pesquera. Maestría en Ciencias Biológicas con especialidad en Parasitología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Experiencia Profesional:

Programa Nacional de Monitoreo de Enfermedades de Organismos Acuáticos por U.A.N.L.

Docente en las áreas de biología, química, formación de emprendedores, orientación vocacional, orientación educativa y etimologías Griegas y Latinas de la escuela industrial y preparatoria “Alvaro Obregón” U.A.N.L.

Responsable del área de Sanidad Acuícola en el Laboratorio Central Regional de Monterrey del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León A.C.

Prestador de Servicios Profesionales certificada por INCA Rural. Coordinadora e Instructora de cursos sobre sanidad acuícola e inocuidad en productos de la pesca.

Docente de las materias Piscicultura y Bioquímica en la Facultad de Medicina Veterinaria del Centro de Estudios Universitarios CEU.

Directora Comercial en el Laboratorio Central Regional del Norte, S.A de C.V.